

**Beschichtung von Titanimplantaten
mit dünnen Polymerfilmen
zur Anbindung des Wachstumsfaktors BMP2**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Corinna Lorenz
aus Salzgitter

1. Referent: Professor Dr. Henning Menzel
2. Referentin: Professorin Dr. Andrea Hoffmann
eingereicht am: 21.12.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.05.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin/den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

- Lorenz, C., Hoffmann, A., Gross, G., Windhagen, H., Dellinger, P., Möhwald, K., Dempwolf, W., Menzel, H.: Coating of Titanium Implant Materials with Thin Polymeric Films for Binding the Signaling Protein BMP2. *Macromolecular Bioscience*, 11: 234-244 (2011).
- Thorey, F., Menzel, H., Lorenz, C., Gross, G., Hoffmann, A., Windhagen, H.: Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta2 coated titanium implants in femora of New Zealand white rabbits. *Indian Journal of Orthopaedics* 45:57-62 (2011).
- Thorey, F., Weinert, K., Weizbauer, A., Witte, F., Willbold, E., Bartsch, I., Hoffmann, A., Gross, G., Lorenz, C., Menzel, H., Windhagen, H.: Coating of titanium implants with copolymer supports bone regeneration: a comparative in vivo study in rabbits. *J. Appl. Biomater. Biomech.* 9:26-33 (2011).
- Dempwolf, W., Lorenz, C., Seiffart, V., Hoffmann, A., Weizbauer, A., Poth, N., Gross, G., Windhagen, H., Menzel, H.: Funktionelle Polymerbeschichtungen zur Modifikation von Implantatoberflächen. (Publikation für den Tagungsband anlässlich eines Vortrages). Tagungsband der 7. Thür. Grenz- und Oberflächentage, S. 243-248 (2011).
- Thorey, F., Menzel, H., Lorenz, C., Gross, G., Hoffmann, A., Windhagen, H.: Enhancement of endoprosthesis anchoring using BMP-2. *Technology and Health Care* 18: 217-229 (2010).
- Thorey, F., Witte, F., Lorenz, C., Nellesen, J., Menzel, H., Gross, G., Windhagen, H.: Controlled implant coupling of BMP-2 via "self assembled monolayers" (SAM) increase significantly bone mass around titanium implants in a rabbit model of implant osseointegration. *ORS Transactions Vol.* 33:359 (2008).

Tagungsbeiträge

- Lorenz, C., Dempwolf, W., Seiffart, V., Gross, G., Thorey, F., Windhagen, H., Menzel, H.: Cross-linked polymer films for binding of growth factors on titanium implants. (Poster) Jahrestagung der DGBM, Gießen (2011).

- Dempwolf, W., Lorenz, C., Seiffart, V., Hoffmann, A., Weizbauer, A., Poth, N., Gross, G., Windhagen, H., Menzel, H.: Funktionelle Polymerbeschichtungen zur Modifikation von Implantatoberflächen. (Vortrag incl. Publikation für den Tagungsband). 7. Thür. Grenz- und Oberflächentage, Zeulenroda-Triebes (2011).
- Poth, N., Slusznia, M., Waßmann, M., Lorenz, C., Pfaffenroth, C., Dempwolf, W., Menzel, H.: Polymer Coatings for Biomedical Applications. (Poster) Workshop "Neue Horizonte für metallische Biomaterialien", Geesthacht (2011).
- Lorenz, C., Hoffmann, A., Seiffart, V., Gross, G., Thorey, F., Windhagen, H., Dempwolf, W., Menzel, H.: Formation of thin polymer interlayers to bind BMP2 onto titanium implant materials. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Heilbad Heiligenstadt (2010).
- Dempwolf, W., Lorenz, C., Pfaffenroth, C., Slusznia, M., Hoffmann, A., Winkel, A., Stiesch, M., Windhagen, H., Menzel, H.: Ultra thin polymer layers as custom made solution for medical applications. (Vortrag) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Heilbad Heiligenstadt (2010).
- Dempwolf, W., Lorenz, C., Hoffmann, A., Menzel, H., Gross, G., Thorey, F., Windhagen, H.: Funktionelle Modifikation von Implantatoberflächen. (Vortrag) SFB Kolloquium "Zukunftsfähige medizinische Implantate", Hannover (2010).
- Dempwolf, W., Pfaffenroth, C., Slusznia, M., Lorenz, C., Hoffmann, A., Winkel, A., Stiesch, M., Windhagen, H., Menzel, H.: Designing Polymer Interlayers to Improve Implant Surfaces. (Vortrag) DPhG Jahrestagung, Braunschweig (2010).
- Adden, N., Lorenz, C., Slusznia, M., Pfaffenroth, C., Dempwolf, W., Stiesch, M., Winkel, A., Heuer, W., Gross, G., Hoffmann, A., Windhagen, H., Thorey, F., Castner, D., Gamble, L., Menzel, H.: Polymers for Functionalization of Titanium Implant Surfaces. (Vortrag) Polydays 2010: Polymers in Biomedicine and Electronics, Berlin (2010).
- Lorenz, C., Hoffmann, A., Gross, G., Thorey, F., Windhagen, H., Gamble, L.J., Castner, D.G., Dempwolf, W., Menzel, H.: „Bioactivation of Titanium Implant Materials” (Poster) 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne (2009).
- Lorenz, C., Adden, N., Hoffmann, A., Gross, G., Windhagen, H., Thorey, F., Menzel, H.: Bone Morphogenic Proteins Covalently Bound to Implant Surfaces via Polymer Interlayers. (Vortrag) 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne (2009).
- Lorenz, C., Hoffmann, A., Gross, G., Thorey, F., Windhagen, H., Gamble, L.J., Castner, D.G., Menzel, H.: Coating of Titanium Implant Materials with Thin Polymeric Films. (Poster) 3rd International Symposium Interface Biology of Implants, Rostock (2009).
- Lorenz, C., Adden, N., Hoffmann, A., Gross, G., Windhagen, H., Thorey, F., Menzel, H.: Binding BMP-2 to titanium implant materials via polymer interlayers. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (2008).

- Lorenz, C., Hoffmann, A., Gross, G., Windhagen, H., Thorey, F., Menzel, H.: Binding BMP2 to titanium implant materials. (Poster) 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam (2008).
- Thorey, F., Witte, F., Nellesen, J., Lorenz, C., Menzel, H., Gross, G., Hoffmann, A., Windhagen, H.: Controlled implant coupling of BMP-2 via "self assembled monolayers" (SAM) increase significantly bone mass around titanium implants in a rabbit model of implant osseointegration. (Vortrag) EFORT, Nizza (2008).
- Thorey, F., Witte, F., Lorenz, C., Nellesen, J., Menzel, H., Gross, G., Windhagen, H.: Controlled implant coupling of BMP-2 via "self assembled monolayers" (SAM) increase significantly bone mass around titanium implants in a rabbit model of implant osseointegration. (Vortrag) Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS), San Francisco (2008).
- Lorenz, C., Adden, N., Hoffmann, A., Gross, G., Windhagen, H., Thorey, F., Menzel, H.: Binding BMP-2 to Titanium Implants. (Vortrag) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Hannover (2007).
- Hoffmann, A., Seiffart, V., Lorenz, C., Menzel, H., Thorey, F., Windhagen, H., Gross, G.: Functional Coupling of Growth Factors and anti-inflammatory proteins to titanium surfaces. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Hannover (2007).
- Thorey, F., Lorenz, C., Adden, N., Hoffmann, A., Gross, G., Menzel, H., Windhagen, H.: Improvement of titanium implants osseointegration after surface coating with BMP-2. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Hannover (2007).
- Lorenz, C., Pfaffenroth, C., Hoffmann, A., Gross, G., Menzel, H.: Functionalization of Titanium Implant Surfaces. (Poster) 7th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Gent (2007).

Danksagung

Prof. Henning Menzel danke ich für die interessante Themenstellung, die es mir ermöglichte, in einem interdisziplinären Umfeld zu arbeiten und das spannende Gebiet der Biomedizintechnik kennenzulernen, die stete Diskussionsbereitschaft sowie die intensive Betreuung.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Andrea Hoffmann für die Übernahme des Korreferates.

Allen Mitgliedern des D7-Projektes des SFB599 danke ich für die gute Zusammenarbeit - ich werde dieses Projekt als bestes Beispiel und Motivation für erfolgreiche interdisziplinäre Zusammenarbeit in Erinnerung behalten. Als erstes sind an dieser Stelle Prof. Dr. Andrea Hoffmann und Dr. Virginia Seiffart vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung zu nennen, die zahlreiche ELISA und BRELUC-Tests durchgeführt haben. Ich danke ihnen für die wunderbar unkomplizierte Zusammenarbeit und dafür, dass ich mich immer mit Fragen an sie wenden konnte, wenn meine Kenntnisse der Biochemie oder Biologie nicht ausreichten. Bei Priv.-Doz. Dr. med. Fritz Thorey von der Orthopädischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich mich für die Durchführung und Auswertung der *in vivo*-Versuche bedanken, ohne die einige Erkenntnisse unentdeckt geblieben wären. Dipl.-Ing. (FH) Andreas Weizbauer aus dem Labor für Biomechanik und Biomaterialien der Orthopädischen Klinik der MHH danke ich für die wertvollen Literaturtipps zu den medizinischen Statistiken. Dr. Andreas Winkel aus der Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde der MHH danke ich für die Durchführung des LDH-Tests. Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des SFB 599.

Dr. Wibke Dempwolf gebührt ein großer Dank für die unzähligen Stunden, die sie bei der Durchführung der XPS-Messungen in Seattle und Mainz verbracht hat, und für ihre Geduld bei der Diskussion der Ergebnisse. Ebenso danke ich ihr für die Aufnahme der AFM-Bilder.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre, in der Hilfsbereitschaft, egal ob es sich um kurze Fragen oder langwierige Diskussionen handelte, groß geschrieben wurde und hoffentlich auch weiterhin wird. Die gemeinsam besuchten Tagungen, insbesondere in Freiburg, und das Seminar auf Spiekeroog sowie die Gruppendynamischen Aktivitäten werden mir immer in positiver Erinnerung bleiben.

Besonders hervorheben möchte ich folgende Kollegen:

Dr. Steffen Harling danke ich für die vielen Insidertipps in meiner Anfangszeit in der Arbeitsgruppe und dafür, dass er als Bürokollege immer gute Laune verbreitet hat.

Dipl.-Chem. Bianca Tiedemann und Nico Timpe (M. Sc.) danke ich für die nette Atmosphäre im Büro und die amüsanten Gespräche zwischendurch. Dipl.-Chem. Andreas Bertz und Aromita Sen (M. Sc.) hatten stets ein offenes Ohr, wenn ich mal nicht weiter wusste - ein großes Dankeschön dafür. Dr. Cornelia Pfaffenroth und insbesondere Dipl.-Chem. Ansgar Niehoff danke ich für die konstruktive Arbeitsatmosphäre im Schreiberbüro und die über das fachliche hinausgehenden Diskussionen während der Endphase. Dipl.-Chem. Magda Slusniak gilt ein großer Dank für die vielen fachbezogenen Diskussionen und die kleinen Hilfsdienste am Ende meiner Arbeit. Meinem Nachfolger im Projekt, Nils Poth (M.Sc.), danke ich für die anregenden Diskussionen und wünsche ihm viel Erfolg bei der weiteren Forschung.

Meinen Praktikanten Anne-Kristin Lüttig, Eike Blume und HiWis Linda Sell, Lina Vollenweider, Susen Hartung und Simon Prescher sowie Nancy Paetsch danke ich für die praktische Unterstützung im Labor.

Rolf Harrendorf aus der Werkstatt der Technischen Chemie danke ich für die vielen Spezialanfertigungen, insbesondere den Nano-Mag DA08-spin-coater, ohne die viele Experimente gar nicht möglich gewesen wären. Anita Scherbarth möchte ich für die Durchführung der REM-Untersuchungen an meinen Proben und die geduldige Suche nach den erwarteten Strukturen danken. Dipl.-Min. Christiane Schmidt vom Institut für Ökologische und Nachhaltige Chemie führte für mich die Untersuchungen am ICP-OES durch. Gabi Schirmer und Christa Vogel danke ich für die Hilfe bei der Abwicklung der im Arbeitsalltag auftretenden papierbasierten Formalitäten.

Dr. Wiebke Hanna Pohl danke ich für die trotz der Entfernung erhaltene mentale Unterstützung und ihr Verständnis dafür, dass ich mich so selten bei ihr gemeldet habe.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung	9
3 Grundlagen	10
3.1 Modifizierung von Oberflächen	10
3.1.1 Methoden zur Beschichtung von Oberflächen	10
3.1.2 Funktionelle Gruppen zur Anbindung an eine Oberfläche	13
3.2 Immobilisierte Proteine in der Medizin	17
3.3 Auswahl der Copolymersysteme zur Immobilisierung von BMP2.....	27
3.3.1 Methoden zur kovalenten Immobilisierung von Proteinen	28
3.3.2 Anbindung an die Oberfläche	32
3.3.3 Ausgewählte Copolymersysteme	33
4 Methoden zur Charakterisierung von Polymeren und dünnen Polymerfilmen.....	35
4.1 Copolymerisation	35
4.2 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma	40
4.3 Ellipsometrie	41
4.4 Kontaktwinkel	48
4.5 Photoelektronenspektroskopie (XPS)	50
5 Synthese der Monomere.....	55
5.1 Synthese von Vinylbenzylphosphonat	55
5.2 Synthese von Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat.....	56
5.3 Synthese von Diethoxyethylmethacrylat.....	57
5.4 Anbindung einer Schutzgruppe an Hydroxyethylmethacrylat	58
6 Copolymerisation und Bestimmung der Parameter	59
6.1 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-diethoxyethylmethacrylat)	59
6.2 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat)	60
6.3 Poly(dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat-co-hydroxyethyl- methacrylat) ...	62
6.4 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-glycidylmethacrylat)	64
6.5 Zusammenfassung	66
7 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-diethoxyethylmethacrylat)	67
7.2 Charakterisierung der Copolymerfilme.....	67
7.2.1 Ellipsometrie und Kontaktwinkel.....	67
7.2.2 XPS von unbehandeltem Titan.....	70
7.2.3 Charakterisierung der Copolymerfilme mittels XPS	72

7.3 Entfernen der Schutzgruppe	73
8 Auf der Aktivierung mit CDI basierende Copolymersysteme	81
8.2 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat)	81
8.2.1 Charakterisierung der Schichten	81
8.2.2 Aktivierung.....	88
8.2.3 Anbindung von BMP	94
8.3 Poly(dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat).....	96
8.3.1 Charakterisierung der Schichten	96
8.3.2 Aktivierung.....	99
8.4 Vergleich	104
9 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-glycidylmethacrylat)	106
9.1 Charakterisierung der Polymerschicht	106
9.1.1 Ellipsometrie	106
9.1.2 Kontaktwinkel	110
9.1.3 Quellungseigenschaften	114
9.1.4 XPS	117
9.2 <i>In-vitro</i> -Untersuchungen	121
9.3 <i>In-vivo</i> -Untersuchungen	132
9.4 Umsetzung mit einem Amin und Nachweis.....	133
10 Zusammenfassung	140
11 Experimenteller Teil.....	143
11.1 Materialien	143
11.1.1 Lösungsmittel	143
11.1.2 Chemikalien	143
11.2 Geräte und Methoden	144
11.2.1 NMR.....	144
11.2.2 Ellipsometrie	146
11.2.3 Kontaktwinkel	146
11.2.4 XPS	146
11.2.5 ICP-OES.....	147
11.2.6 Elementaranalyse	147
11.2.7 AFM	147
11.2.8 REM	147
11.2.7 Polieren.....	148

11.2.8 Spin-coating	148
11.3 Monomersynthesen	148
11.3.1 Synthese von Vinylbenzylphosphonat	148
11.3.2 Synthese von trimethylsilyl-geschütztem Hydroxyethylmethacrylat	149
11.3.3 Synthese von Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat.....	150
11.3.4 Diethoxyethylmethacrylat	151
11.4 Copolymerisationen	152
11.4.1 Synthese von Poly-VBP-co-GMA	152
11.4.2 Synthese von Poly-VBP-co-HEMA-TMS und Entfernen der Schutzgruppe	152
11.4.3 Synthese von Poly-DMMEP-co-HEMA-TMS und Entfernen der Schutzgruppe	153
11.4.4 Synthese von Poly-VBP-co-DEEMA	153
11.5 Aufbringen der Polymere auf die Oberfläche	153
11.6 Reaktionen auf der Oberfläche.....	154
11.6.1 Umsetzung mit Ethylendiamin.....	154
11.6.2 Umsetzung mit CDI zur Aktivierung.....	154
11.6.3 Entfernen der Schutzgruppe an Poly-VBP-co-DEEMA	155
11.7 <i>In-vitro</i> -Untersuchungen	155
11.7.1 Immobilisierung von BMP2.....	155
11.7.2 ELISA.....	155
11.7.3 BRELuc	156
11.7.4 Kompatibilitätstest	156
11.8 <i>In-vivo</i> -Untersuchungen	157
12 Literatur.....	158
Anhang	171

Abkürzungsverzeichnis

ACS	absorbierbarer Collagen-Schwamm (absorbable collagen sponge)
AFM	Atomic Force Microscope
AiBN	Azobisisobutyronitril
ALP	alkalische Phosphatase
AOEMA	2-(Acryloyloxy) ethyl 2-Methylacrylat
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
BE	Bindungsenergie
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BREluc	Test beruhend auf einem BMP Responsive Element in der Promotorregion, bei dem in Antwort auf die Bindung von BMP-abhängigen Signalmediatorproteinen (Smads) Luziferase synthetisiert und anschließend die enzymatische Aktivität nachgewiesen wird
BV/TV	Quotient aus Knochenvolumen und totem Volumen
CDI	1,1-Carbonyldiimidazol
CPC	Calcium-Phosphat-Zement
DCS	Disuccinimidylcarbonat
DMAEMA	2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylat
DMMEP	Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -Ethyl-Carbodiimidhydrochlorid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FMMA	Formylmethylemethacrylat
GMA	Glycidylmethacrylat
HA	Hyaluronsäure
HAP	Hydroxylapatit
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEMA-TMS	trimethylsilyl-geschütztes Hydroxyethylmethacrylat
ICP	Inductive Coupled Plasma
IL-1, IL-6	Interleukine
IR	Infrarot
KT	Kelen-Tüdös

LbL	Layer by Layer
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L-DOPA	2,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NAD ⁺	oxidierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NASI	N-Acryloxysuccinimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OES	Optische Emissionsspektrometrie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEO	Polyethylenoxid
PEG	Polyethylenglykol
PEGMA	Poly(ethylenglykol) Methacrylat
PLA	Polymilchsäure
PGA	Polyglykolsäure
PLGA	Poly(lactid-co-glykolid)
PLLA	Poly-L-Milchsäure
PCLA	Polycaprolacton
PS	Polystyrol
PVD	Physical Vapour Deposition
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RSF	Relativer Sensitivitätsfaktor
SAM	Self-Assembled Monolayer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI-ATRP	Surface Initiated Atom Transfer Radical Polymerization
T-BAG	der Benutzung eines Teebeutels nachempfundene Beschichtungsmethode
TCP	Tricalciumphosphat
TCPS	Tissue Culture Polystyrene
TGF- β	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	ultraviolett
VA	Vinylalkohol

VAc	Vinylacetat
VBP	Vinylbenzylphosphonat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XPS	Photoelektronenspektroskopie

Symbolverzeichnis

A	Akzeptanzfläche
A	elektrische Feldstärke
A_0	Amplitude
α	Konstante bei Kelen-Tüdös
β	Filmphasendicke
δ_h	hydrodynamische Schichtdicke
δ_{rms}	root-mean-square Schichtdicke
e	Polarität
E_0	Pass-Energie
E_B	Bindungsenergie
E_i/E_r	Energie der einfallenden/reflektierten Welle
E_{kin}	kinetische Energie
ΔE	Breite bei halber Höhe des Peaks
η	Photonenflussdichte
γ	freie Energie einer Grenzfläche
h	Planck-Konstante
i	Orbital
I	Intensität der Elektronen
I_i/ I_r	Intensität der einfallenden/ reflektierten Welle
j	Spin-Bahn-Kopplung
k	Geschwindigkeitskonstante
k	Extinktionskoeffizient
l	Bahndrehimpuls
λ	Wellenlänge
λ	mittlere freie Weglänge
M	Molekulargewicht

$M\cdot$	Monomerradikal
n	Brechungsindex
n	Hauptquantenzahl
\tilde{N}	komplexer Brechungsindex
ν	Frequenz
P	Wahrscheinlichkeit
Φ	Austrittsarbeit
Φ_i	Einfallswinkel
Φ_r	Reflektionswinkel
Q	Reaktivität
r	Copolymerisationsparameter
R	Reflektionsgrad
R_g	Gyrationsradius
R^P	totaler Reflektionskoeffizient
s	Spin
σ	Querschnitt der Photonenwechselwirkung
t	Zeit
T	Transmissionsfunktion
θ	Winkel zwischen zwei Phasen
Θ	Take-Off-Winkel
v	Geschwindigkeit
w	Breite des Ein- oder Austrittspalts
x	Distanz
X	Zusammensetzung der Monomerenmischung
Y	Zusammensetzung des Copolymers
ξ	Phasenwinkel

1 Einleitung

In der Fallpauschalenbezogenen Krankenhausstatistik der vollstationären Patienten in Krankenhäusern vom Statistischen Bundesamt für das Jahr 2008 rangieren die Operationen an den Bewegungsorganen mit 3,7 Milliarden Fällen auf dem ersten Platz.^[1] Die Implantation einer Endoprothese am Hüftgelenk (209487 Operationen) liegt dabei direkt hinter den arthroskopischen Operationen am Gelenkknorpel und den Menisken (285601 Operationen) und belegt damit den 6. Platz in der Liste der 50 am häufigsten durchgeführten Operationen im Jahr 2008 in Deutschland.^[1] Für eine internationale Übersicht haben MERX et al. die Daten von Gesundheitsbehörden und Implantatherstellern aus den 90er Jahren zusammengefasst und konnten auf diesem Weg die Implantationsraten bestimmen. Abhängig vom Land wurden jährlich zwischen 50 und 120 Implantationen von Hüftendoprothesen pro 100 000 Einwohner durchgeführt.^[2] Bei 65-90 % der Fälle war eine Osteoarthritis der Grund, da ein künstliches Hüftgelenk die Beschwerden verringert und die Funktion des Gelenks wiederherstellt.^[2] Auch die aktuelle Statistik für Deutschland belegt, dass bei einer diagnostizierten Arthrose des Hüftgelenks diese in 57,9 % der Fälle mit der Implantation einer Endoprothese behandelt wurde.^[1]

Abbildung 1 zeigt ein künstliches Hüftgelenk bestehend aus einem metallischen Schaft, der in den Oberschenkelknochen eingesetzt wird, und dem darauf befestigten Hüftkopf. Dieser bewegt sich in einer Pfanne, die in vielen Fällen aus einem Polyethylen-Inlet in einer Metallschale besteht.

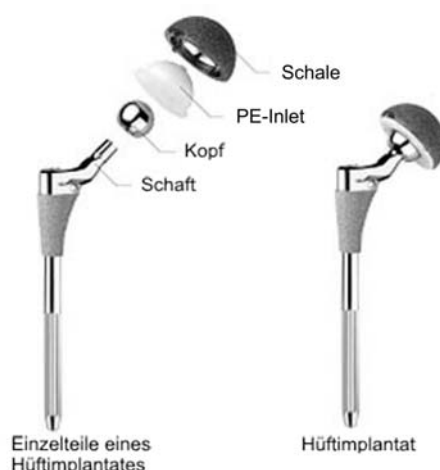


Abbildung 1: Aufbau eines Hüftimplantates¹

¹ Bildquelle: www.healthbase.com am 19.06.2011

Als Material für den Schaft, der in den Oberschenkelknochen eingesetzt wird, sowie für die Schale hat sich im Laufe der Jahre Titan beziehungsweise die Titanlegierung Ti6Al4V etabliert. Zunächst von BRÄNEMARK für dentale Implantate eingesetzt,^[3] erweiterte sich der Einsatzbereich des Titans durch die hervorragenden mechanischen Eigenschaften^[4] und die Biokompatibilität^[5] auch auf andere Implantate. Insbesondere die Oxidschicht, die bei Kontakt mit Luft spontan gebildet wird, trägt zu der chemischen Inertheit und Korrosionsbeständigkeit bei.^[6] Ebendiese Oxidschicht verhindert ebenfalls die Diffusion von Metallionen in die Umgebung und schützt so vor der Anreicherung der Ionen im Gewebe und möglichen allergischen Reaktionen.^[6] Titan und seine Legierungen sind daher heutzutage ein vielseitig eingesetztes Material, neben dentalen Implantaten und künstlichen Hüftgelenken wird es auch zur Herstellung von Herzschrittmachern, Herzklappen und Trommelfelldrainageröhren verwendet.^[4, 5, 7]

30 % der künstlichen Hüftgelenke müssen jedoch innerhalb von 10-15 Jahren ausgetauscht werden.^[8] Der Anteil der Revisionsoperationen lag daher im Jahr 2004 in Deutschland bei insgesamt 11,4 %^[9] und in den USA in den Jahren 1990-2002 sogar bei 17,5 %.^[9] Der Hauptgrund für das Versagen des Implantats ist dabei die aseptische Lockerung mit bis zu 80 % Prävalenz,^[10] außerdem können Infektionen (7,9 %), Dislokation (7,5 %) und periprothetische Frakturen (5,7 %) für den Verlust des Implantates verantwortlich sein.^[9]

Die wesentlichen Gründe für eine aseptische Prothesenlockerung sind der durch Abriebpartikel resultierende Knochenverlust, das durch die Prothese beeinflusste Knochen-Remodelling, bei dem beispielsweise die Abschirmung vor mechanischer Belastung (das sogenannte *stress shielding*) erfolgt, und der Knochenabbau auf Grund von Alterung.^[10] Die als Hauptursache betrachteten Abriebpartikel^[11, 12] entstehen durch unterschiedliche Arten von Reibung innerhalb des künstlichen Gelenks oder beim Kontakt des Gelenkes mit dem Knochen und breiten sich dann über den ganzen Körper aus. Auf diesem Weg gelangen sie auch in den Raum zwischen Knochen und Implantat beziehungsweise Knochen und Zement und rufen dort vielfältige Reaktionen hervor. Bei diesen nacheinander aber auch gleichzeitig ablaufenden Reaktionen handelt es sich um die Akkumulation der Partikel im Gewebe, Phagozytose,^{II} inflammatorische Reaktionen der Granulozyten,^{III} die Freisetzung von

^{II} Phagozytose: Einverleibung und anschließende Zersetzung von festen Partikeln durch Phagozyten [Diese und weitere Definitionen in den Fußnoten wurden soweit nicht anders gekennzeichnet entnommen aus: *Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch*, 261. Aufl., Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, **2007**]

^{III} Granulozyten: bestimmte Art von Leukozytenzellen, die an der unspezifischen Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sind und somit eine grundlegende Aufgabe bei der Bekämpfung von Entzündungen innehaben.

Knochenresorption induzierenden Substanzen sowie schließlich die Aktivierung der Osteoklasten und die darauf folgende Osteolyse.^[10] Ein Teil dieser komplexen biologischen Reaktion ist vereinfacht in Abbildung 2 dargestellt.

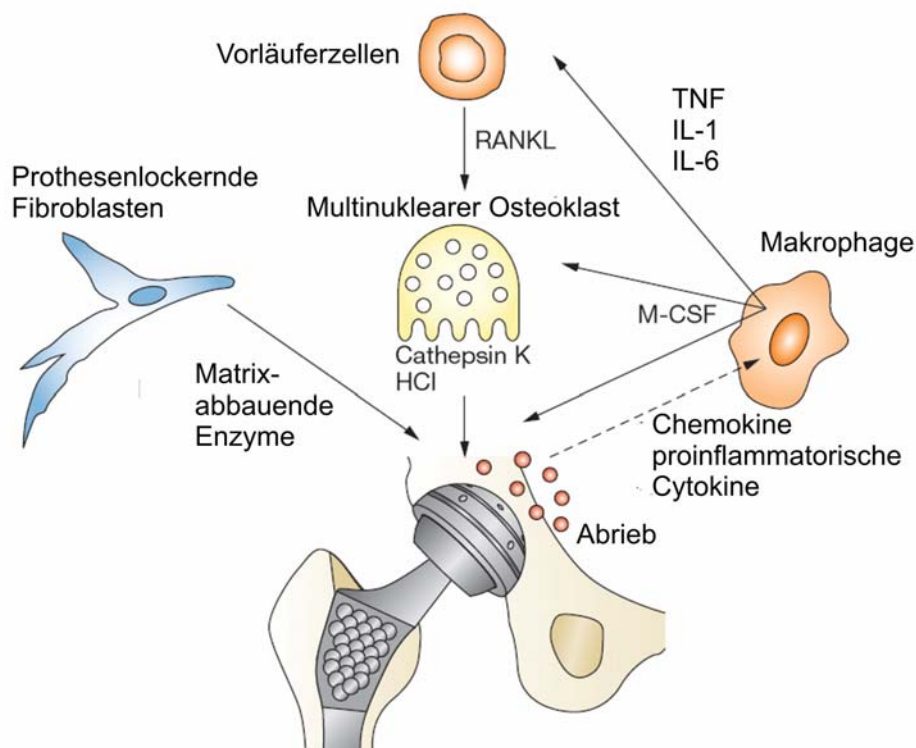


Abbildung 2: Abriebpartikel induzieren Knochenresorption durch Wechselwirkungen mit Makrophagen, Osteoklasten und Fibroblasten.^[12] Erläuterungen siehe Text.

Die Abriebpartikel locken Makrophagen heran, welche im Kontakt mit diesen oder nach Phagozytose proinflammatorischen Signalproteine wie TNF, IL-6 und IL-1 produzieren.^[10] Diese vermitteln die Differenzierung von Vorläuferzellen zu multinukleären Osteoklasten. Außerdem tragen aggressive prothesenlockernde Fibroblasten zur Knochenresorption bei.^[12]

Auf Grund der steigenden Lebenserwartung in Verbindung mit ansteigenden Zahlen von Adipositas einerseits, andererseits aber auch intensiverer sportlicher Tätigkeit bei anderen Teilen der Bevölkerung, ist anzunehmen, dass die Zahl der Erstimplantationen in den nächsten Jahren stark ansteigen wird.^[9, 13] Hochrechnungen für die USA gehen von einem Anstieg von 174 % vom Jahr 2005 bis zum Jahr 2030 mit einer Gesamtzahl von 572000 Hüftimplantationen für das letzte Jahr aus.^[13] Auf Grund der bislang begrenzten Haltbarkeit der Implantate ist daher auch mit einer steigenden Anzahl an Revisionsoperationen zu rechnen, die dabei erzielten Resultate sind jedoch schlechter als bei einer Erstimplantation und es treten häufiger Komplikationen auf.^[14] Eine Verbesserung der Implantate hinsichtlich ihrer Integration und damit der Haltbarkeit ist daher wünschenswert.

Die mechanischen Eigenschaften werden durch die Eigenschaften der Masse des Implantates bestimmt, die Wechselwirkungen an der Knochen-Implantat-Grenzfläche werden jedoch durch die Oberfläche beeinflusst.^[15] Insbesondere bei schlechter Knochenqualität wäre es vorteilhaft, gezielt Mechanismen für eine verbesserte Osseointegration aktivieren zu können.^[15] Oberflächeneigenschaften wie Morphologie und Topologie, die chemische Zusammensetzung, aber auch Oberflächenenergie und -ladung werden in diesem Zusammenhang als wichtige Faktoren betrachtet.^[16] Der davon am häufigsten untersuchte Ansatz ist die Topographie des Implantats. SHALABI et al. haben versucht, die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien zusammenzufassen und sind nach Sichtung der Literatur zu dentalen Implantaten zu dem Ergebnis gekommen, dass eine höhere Rauheit zu einem erhöhten Knochen-Implantat-Kontakt führt.^[17] Über den genauen Wert der erforderlichen Rauheit können jedoch keine Aussagen getroffen werden, da die Ergebnisse sehr heterogen sind.^[17, 18]

Ein anderer Weg zur Verbesserung der Osseointegration ist die Beschichtung mit knochenähnlichen Substanzen, das heißt Calciumphosphaten. Insbesondere Hydroxylapatit, das bereits im menschlichen Knochen und Zahnschmelz vorhanden ist, bietet sich auf Grund seiner Biokompatibilität und osteokonduktiven Eigenschaften an.^[19] SHEPPERD und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Femur-Komponente der Furlong-HAP beschichteten Hüftendoprothese gute Ergebnisse über einen mittleren Zeitraum erzielt, wenn sie während einer Erst- oder Revisionsoperation eingesetzt wird. Die Überlebensdauer bei 17 Jahren betrug 97,4 %, wenn als Endpunkt die Revision betrachtet wurde.^[20] GOOSEN et al. fanden in ihrer systematischen Studie jedoch heraus, dass es hinsichtlich des Einwuchses des Knochens keinen Unterschied zwischen porös beschichteten Implantaten mit oder ohne Hydroxylapatit gab.^[19] Daher wird zeitgleich auch der Einsatz von bioaktiven Molekülen, die die Osseointegration verbessern sollen, erforscht. Die wichtigsten Vertreter und deren Anwendung werden im Folgenden näher betrachtet.

Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)

Die Aminosäure-Sequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) innerhalb der extrazellulären Matrix-Proteine (ECM-Proteine) ist maßgeblich an der Anbindung von Integrinen beteiligt, die sich in der Zellmembran befinden, so dass mit Hilfe von RGD die Adhäsion von Zellen auf Oberflächen gefördert werden kann.^[21] BELLIS beschreibt in ihrem Übersichtsartikel die Vorteile von RGD gegenüber vollständigen Proteinen, welche in der Erhaltung der

Funktionalität während der Modifizierungsschritte und der einfachen und kostengünstigen Synthese liegen. Weiterhin wird das Risiko einer Immunantwort minimiert, da als Quelle für die natürlichen Proteine oft andere Lebewesen oder Kadaver eingesetzt werden. Außerdem erlaubt die Verwendung einer Aminosäuresequenz die Immobilisierung in kontrollierter Dichte und Orientierung auf der Oberfläche.^[21] CHUA et al. konnten beispielsweise RGD mittels EDC/NHS in verschiedenen Dichten auf der äußersten Schicht von Multischichten aus Hyaluronsäure und Chitosan, die über ein LbL-Verfahren^{IV} hergestellt wurden, anbinden.^[22] Dabei zeigte sich, dass die Proliferation der darauf kultivierten Osteoblasten von der Dichte der angebundenen Peptid-Sequenz abhängig ist: Je höher die Dichte, desto mehr Osteoblasten befinden sich auf der Oberfläche. GAWALT et al. konnten außerdem zeigen, dass die Anbindung von RGD über Maleinsäure-aktivierte Phosphonsäure auf Ti6Al4V möglich ist und die Zahl der Osteoblasten kontinuierlich zunimmt.^[23] ELMENGAARD et al. verwendeten stattdessen ein zyklisches RGD-Peptid, welches bereits einen Thiol-Anker trägt, zur Immobilisierung auf zylindrischen Titanimplantaten. Die histologischen Untersuchungen zeigen, dass sowohl auf dem Implantat als auch in dem Bereich bis 100 µm um das Implantat eine deutlich verbesserte Knochenbildung im Vergleich zu der Kontrolle zu beobachten ist.^[24] Somit zeigte sich in den *in-vitro*-Untersuchungen eine deutliche Verbesserung gegenüber unbehandelten Substraten. Die Ergebnisse der *in-vivo*-Untersuchungen sind jedoch nicht so eindeutig. Der Knochen-Implantat-Kontakt von Titanimplantaten im Hundekiefer konnte nach drei Monaten durch die Beschichtung mit Collagen und RGD im Vergleich zur Kontrolle ($26,5 \pm 31,2$ % gegenüber $42,1 \pm 19,7$ %) zwar verbessert werden, jedoch wird die Effektivität dieser Beschichtung auf Grund der hohen Standardabweichungen von den Autoren als schwach eingeschätzt.^[25] SCHLIEPHAKE et al. begründen dies ebenso wie BELLIS mit den zusätzlich auf der Implantatoberfläche adsorbierten natürlichen Proteinen, welche mit der RDG-Sequenz konkurrieren oder dessen Wirkung sogar überlagern.^[21, 25] Eine weitere Ursache für die abweichenden *in-vivo*-Ergebnisse kann außerdem die Vielfalt der natürlich vorkommenden RGD-enthaltenden Matrixproteine sein, welche unterschiedliche zelluläre Antworten hervorrufen. Die komplexe Signalkaskade, die durch die verschiedenen Matrixproteine verursacht wird, kann somit nicht allein durch das isolierte RGD-Motiv nachgestellt werden.^[21]

^{IV} Layer-by-Layer-Verfahren: Herstellung eines Multischichtsystems durch die wiederholte elektrostatische Anlagerung von Monoschichten gegensätzlich geladener Polyelektrolyte auf einem Substrat.

Transforming Growth Factor β (TGF- β)

Die TGF- β (*transforming growth factor- β*) gehören zur TGF- β -Superfamilie und die fünf bekannten Subtypen sind in der Lage, eine große Anzahl von Geweben zu beeinflussen, da sie zum Beispiel die Gewebeentwicklung in der embryonalen Phase vermitteln, aber auch an der zellulären Physiologie und der Gewebereparatur beteiligt sind.^[26] Dieser Wachstumsfaktor beeinflusst dabei insbesondere die Proliferation der Zellen, abhängig von der Art der Zelle und den äußeren Bedingungen kann das Wachstum gefördert oder inhibiert werden.^[27] Im Allgemeinen wird dabei die Proliferation von mesenchymalen Zellen und Osteoblasten in Frakturen und experimentellen Knochendefekten stimuliert, während ektodermale^V Zellen inhibiert werden.^[26] Zahlreiche Tierversuche konnten bestätigen, dass durch die Applikation von TGF- β die Knochenheilung gefördert und die Integration von Implantaten verbessert wird;^[28] im Gegensatz zu BMPs (*bone morphogenetic proteins*) wird jedoch kein ektopisches^{VI} Knochenwachstum beobachtet.^[26] SUMNER et al. konnten zeigen, dass die Integration eines mit Hydroxylapatit und TGF- β beschichteten Implantats bei einer Dosis von 120 μg pro Implantat gegenüber der Kontrolle signifikant verbessert ist.^[29] Eine höhere Dosis von 335 μg pro Implantat zeigt hingegen eine schwächere Integration im Vergleich zu der geringen Dosis und deutet darauf hin, dass hier die inhibierenden Effekte des TGF- β zum Tragen kommen. FISCHER et al. beobachteten außerdem, dass TGF- β zwar in der Lage ist, Osteoblasten zur Synthese von Collagen anzuregen, es aber daneben einen inhibierenden Effekt auf die Differenzierung und Mineralisation hat.^[27] Die Autoren schlagen daher eine Kombination mit beispielsweise BMP vor, welches die Differenzierung der Osteoblasten fördert.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die Integration eines Implantats kann durch die Anbindung von Proteinen oder Peptid-Sequenzen, welche die Adhäsion und Proliferation bestimmter Zellen fördern, verbessert werden. Die Blutzufuhr spielt jedoch ebenfalls eine entscheidende Rolle, denn diese ist wichtig für die ausreichende Nährstoffzufuhr, den Transport von Makromolekülen sowie das Eindringen von Zellen.^[30] Die Förderung der Angiogenese^{VII} durch den Einsatz des Signalmoleküls VEGF (*vascular endothelial growth factor*) verspricht somit eine verbesserte Heilung und Integration des Implantats.^[31] POH et al. immobilisierten VEGF mit Hilfe von

^V ektodermal: bezogen auf das Ektoderm, das äußere der drei embryonalen Keimblätter, aus dem sich die Haut, Sinnesorgane sowie das Nervensystem bilden

^{VI} ektopisch: Verlagerung von Gewebe- oder Organen an eine untypische Position innerhalb des Körpers

^{VII} Angiogenese: Bildung neuer Blutgefäße

Polydopamin auf Titan und bestätigten mittels ELISA, dass $26 \pm 2,5 \text{ ng/cm}^2$ auf der Oberfläche angebunden sind.^[31] Die mit VEGF-immobilisierten Substrate zeigen eine signifikante Verbesserung der Adhäsion von HDMEC (*human dermal microvascular endothelial cells*) gegenüber unbehandeltem Titan sowie eine deutlich gestiegene Proliferationsrate nach 14 Tagen. Damit konnten sie bestätigen, dass VEGF in der Lage ist, ein kontinuierliches Wachstum von Endothelzellen anzuregen sowie die Differenzierung von Stammzellen in Endothelzellen zu induzieren. Bei der Knochenneubildung treten Wechselwirkungen zwischen den VEGF- und BMP induzierten Vorgänge auf, so dass KEMPEN et al. den Ansatz einer kontrollierten Freisetzung beider Faktoren aus einem Implantat ausgewählt und untersucht haben.^[30] Dazu lagerten sie mit BMP2 beladene PLGA-Mikrosphären in Poly(propylenfumarat) ein, welches anschließend in ein mit VEGF beladenes Gelatin-Hydrogel eingebettet wurde. Die Resultate zeigen, dass die Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren ein stärkeres Knochenwachstum induziert als ein Faktor allein und die Blutgefäßbildung durch BMP2 nicht beeinträchtigt wird.

Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)

BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) wird auf Grund seiner Strukturmerkmale und des Einflusses auf das Zellwachstum und die Differenzierung ebenso wie TGF- β der TGF- β -Superfamilie zugeordnet. Im Vergleich dazu besitzt es jedoch ein höheres osteoinduktives Potential.^[26, 32] BMP2 beeinflusst die Knochenneubildung und das Remodelling, indem es die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten-Vorläuferzellen, das heißt knochenbildende Zellen, induziert.^[26, 32] Diese osteoinduktive Wirkung wurde in mehreren Tierversuchen bestätigt, da durch die Applikation von BMP2 ein ektopisches Knochenwachstum ausgelöst wurde.^[33-35] Die Einsatzmöglichkeiten in der Humanmedizin wurden bereits schnell erkannt,^[36-38] so dass heutzutage an einem Einsatz von BMP2 bei Frakturen und Knochendefekten^[39-42] sowie bei der Implantation von Zahnersatz^[43-45] und Endoprothesen^[14, 46, 47] geforscht wird.

Die einfache Injektion einer entsprechenden Proteinlösung hat sich nicht als vorteilhaft erwiesen, da BMP2 auf Grund seiner guten Löslichkeit leicht von den Körperflüssigkeiten abtransportiert wird.^[48] KARAGEORGIOU et al. haben in Untersuchungen mit BMP2 auf Seidenfibroin gezeigt, dass der Einsatz eines immobilisierten Proteins effizienter ist als die Gabe des löslichen Proteins, da die Aktivität von alkalischer Phosphatase^{VIII} bei ca. 60 ng

^{VIII} alkalische Phosphatase: Phosphorsäuremonoester-Hydrolase; eine vermehrte Aktivität der Osteoblasten führt zu erhöhten Werten

immobilisiertem BMP2 etwa sechs mal so hoch ist wie die bei 35 ng löslichem BMP2 und außerdem die Mineralisation stark erhöht wurde.^[49] Untersuchungen von KARAGEORGIOU zeigen außerdem, dass eine kovalente Immobilisierung gegenüber einer Adsorption bessere Ergebnisse erzielt.^[49] JENNISSEN und seine Mitarbeiter konnten hingegen keinen deutlichen Vorteil einer kovalenten Immobilisierung gegenüber einer Adsorption feststellen, da der Knochen-Implantat-Kontakt abhängig von der Art des Knochens variierte.^[50] In einer Studie vergleichen JENNISSEN und seine Mitarbeiter die Wirkung von kovalent immobilisiertem BMP2 auf einem mit Knochenhaut umwickelten Titanimplantat im Wadenmuskel mit der eines unbeschichteten Implantats, bei dem in die Muskeltasche BMP2 injiziert wurde.^[51] In histomorphometrischen Untersuchungen konnte kein Unterschied bei dem Knochenvolumen und weiteren Parametern beobachtet werden. Einziger Unterschied ist der Knochen-Implantat-Kontakt, der nur bei den Implantaten mit immobilisiertem BMP2 zu beobachten war. Bei den Implantaten mit löslichem BMP2 wurde hingegen eine Bindegewebsschicht beobachtet, die eine Osseointegration des Implantats verhindert und daher zu vermeiden ist.

2 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer biokompatiblen und bioaktiven Beschichtung für Hüftendoprothesen. Die Bioaktivität wird dabei durch die Anbindung eines körpereigenen Wachstumsfaktors erzeugt, während die Wahl der Immobilisierungsmethode über die Biokompatibilität entscheidet. Zur Lösung des dargestellten Problems werden im Rahmen dieser Arbeit polymere Zwischenschichten entwickelt, die einerseits in der Lage sind, an die Oberfläche des Implantatmaterials zu binden, andererseits den Wachstumsfaktor BMP2 kovalent zu immobilisieren. Durch den Einsatz von Copolymeren können diese Anforderungen ohne aufwändige Synthesen erfüllt werden, da die jeweiligen Monomere in einem Reaktionsschritt miteinander kombiniert werden können. Zudem ist eine Variation der Monomere oder deren Anteile leicht durchzuführen. In vorangehenden Arbeiten von ADDEN hat sich die Verwendung von Phosphonsäuren und Phosphonaten als effektive Methode zur Immobilisierung auf Titan und Titanlegierungen herausgestellt. Basierend auf Untersuchungen von JENNISSEN et al. wird zur Immobilisierung des BMP2 eine kovalente Anbindung gewählt, da die biologische Aktivität dadurch nicht geschädigt wird und außerdem eine effizientere Integration der Implantate beobachtet werden konnte. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Copolymere enthalten daher ein Monomer, welches eine Phosphonatgruppe zur Anbindung an die Titanoberfläche trägt, während das Comonomer eine funktionelle Gruppe enthält, welche in der Lage ist, mit der Aminogruppe eines der im BMP2 enthaltenen Lysine zu reagieren. Aus den ausgewählten Copolymeren werden zunächst Filme auf Titansubstraten hergestellt und diese mittels verschiedener oberflächenanalytischer Methoden charakterisiert. Die Schichtdicke und der Kontaktwinkel werden in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Copolymers untersucht sowie die Zusammensetzung der Filme mittels XPS analysiert. Anschließend werden weitere Untersuchungen zur Eignung der Filme als Implantatbeschichtung in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Zur Überprüfung der Anbindung des BMP2s wird zunächst die immunologisch nachweisbare Menge mit Hilfe eines ELISA-Testes bestimmt. Entscheidend für die Wirksamkeit der Beschichtung ist der Erhalt der biologischen Aktivität des Proteins, daher wird diese mit einem BREluc-Assay überprüft. Sind die Ergebnisse vielversprechend, erfolgen in Zusammenarbeit mit der Orthopädischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover zusätzlich *in-vivo*-Untersuchungen im Tier.

3 Grundlagen

3.1 Modifizierung von Oberflächen

Bei vielen Anwendungen im Alltag und in der Industrie stehen heutzutage nicht mehr die Eigenschaften des Materials im Vordergrund, sondern die der Oberfläche und deren Wechselwirkungen mit der Umgebung. Wichtige Beispiele sind der Korrosionsschutz oder die Verbesserung der Adhäsion von Lackierungen oder Klebstoffen, für die die Oberfläche gezielt mit einer Beschichtung versehen wird. Insbesondere aber auch im medizinischen Bereich an der Grenzfläche zwischen Mensch und Material werden Beschichtungen zur Erhöhung der biologischen Verträglichkeit eingesetzt.^[52-55]

3.1.1 Methoden zur Beschichtung von Oberflächen

Um dünne Beschichtungen zur Verbesserung der Oberflächeneigenschaften herzustellen, gibt es eine ganze Reihe von Möglichkeiten, die auf die speziellen Anforderungen abgestimmt werden müssen.

Zur Herstellung von Langmuir-Blodgett-Filmen wird ein monomolekularer Film von einer Wasseroberfläche auf ein Substrat übertragen. Die Einschränkung hinsichtlich der Substrate und einsetzbaren Moleküle sowie die geringe Adhäsionsstärke erschweren jedoch die Anwendung im größeren Maßstab.^[56] Eine deutlich verbesserte Anbindung an die Oberfläche ermöglichen SAMs (*self assembled monolayer*), die aus dicht gepackten Monoschichten eines kovalent gebundenen Moleküls bestehen. Diese sind im Allgemeinen jedoch auf niedermolekulare Alkylketten mit α,ω -Funktionalisierung beschränkt.^[56] Sollen Polymere auf die Oberfläche aufgebracht werden, ist die einfachste Methode die Physisorption aus einer Lösung. Kritisch dabei ist jedoch die leichte Desorption, die einen Einsatz dieser Methode in vielen Fällen verhindert, denn insbesondere bei Beschichtungen auf Implantaten ist eine angemessene Stabilität erforderlich.^[56] Eine kovalente Anbindung der Polymere umgeht dieses Problem. Eine sehr vielseitig einsetzbare Methode ist das *grafting from*. Dazu wird zunächst ein Initiator in Form einer SAM auf die Oberfläche aufgebracht, welcher als Startpunkt für die Kettenwachstumsreaktion genutzt wird.^[57] Zur Herstellung werden in der Regel kontrollierte Kettenwachstumsreaktionen verwendet, um beispielsweise die Schichtdicke einstellen zu können. RAYNOR et al. setzen dazu einen ATRP-Initiator mit Silanfunktion ein, um Oligo(ethylenglykol)methacrylat-Bürsten auf der Oberfläche von Titan herzustellen.^[58] Da der Abstand der Verankerungspositionen im Normalfall geringer ist als

der Raumbedarf der Polymermoleküle, nehmen die Polymere eine gestreckte Konformation ein, die als Polymer-Bürste bezeichnet wird.^[59] Ist der Abstand der Verankerungsstellen jedoch größer als der Raumbedarf des Moleküls, liegen isolierte Polymerknäule vor, die je nach Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel eine Pilz- oder Pfannkuchenkonformation wie in Abbildung 3 dargestellt einnehmen.^[59]

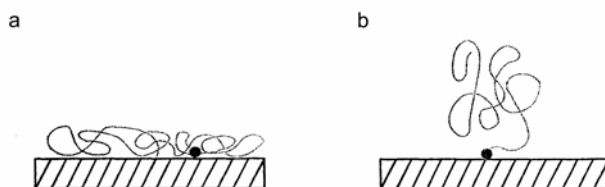


Abbildung 3: Polymere in a) Pfannkuchen- und b) Pilzkonformation^[56]

Die Pfannkuchen- und Pilzkonformationen entstehen eher beim *grafting onto*-Verfahren, bei dem das Polymer eine oder mehrere funktionelle Gruppen besitzt, die mit reaktiven Gruppen auf der Oberfläche reagieren. Da die Polymere im Verlauf der Reaktion durch einen Konzentrationsgradienten zur Oberfläche hin diffundieren müssen, ist die Propfdichte auf der Oberfläche bei dieser Reaktion eher gering.^[56] Wird das Polymer über mehrere funktionelle Gruppen angebunden, bilden sich wie in Abbildung 4 dargestellt Schleifen und Enden aus.^[60]

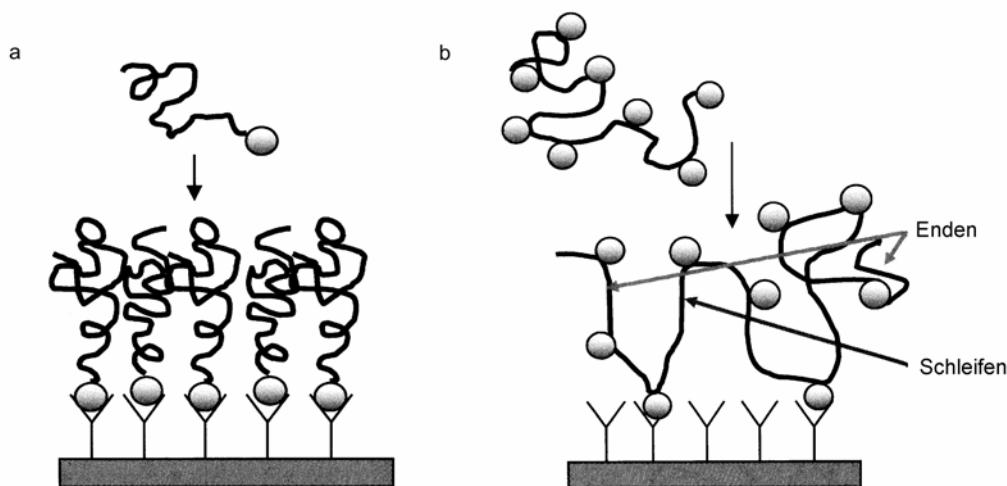


Abbildung 4: Polymerbürsten mit a) einem oder b) mehreren Anknüpfungspunkten^[60]

Einflüsse auf die Schichtdicke

Eine theoretische Vorhersage der Schichtdicke ist auf Grund der verschiedenen Einflussgrößen, beispielsweise Molekulargewicht, Zahl der Anknüpfungspunkte oder Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, schwierig. PRUCKER et al. haben eine photochemische Anknüpfungsmethode entwickelt, bei der ein Benzophenon-Anker auf die entsprechende Oberfläche aufgebracht wird und mit Hilfe von UV-Strahlung ein sich darauf

befindendes Polymer kovalent angebunden wird.^[61] Die Autoren konnten zeigen, dass die Schichtdicke des gebundenen Polymerfilms im Fall von Polystyrol und Polyethylenoxid mit dem Molekulargewicht des Polymers steigt. Die Schichtdicke entspricht etwa $0,4 R_g$,^[61] wobei für Polystyrol der Gyrationsradius R_g in nm mit der Formel

$$R_g = 0,0275 \sqrt{M_w} \quad \text{Gleichung 1}$$

berechnet werden kann.^[62]

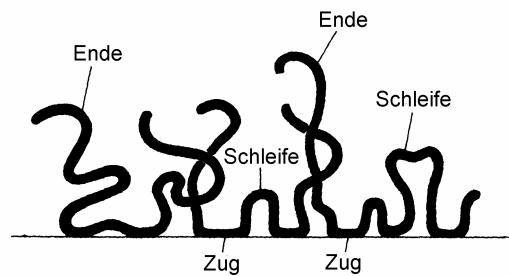


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines adsorbierten Polymers^[59]

FLEER und SCHEUTJENS befassten sich intensiv mit der theoretischen Berechnung der Adsorption von Homo- und Copolymeren an Oberflächen (vgl. Abbildung 5). Dazu definierten sie eine hydrodynamische Schichtdicke δ_h einer adsorbierten Polymerschicht, die sich durch die Änderung des Geschwindigkeitsprofils in einer Kapillare mit dem Durchmesser $a - \delta_h$ im Vergleich zum Geschwindigkeitsprofil in einer Kapillare mit dem Durchmesser a bestimmen lässt.^[59] Diese wird im Wesentlichen durch die Kettenenden bestimmt, während die ellipsometrisch bestimmte Schichtdicke und die *root mean square*-Schichtdicke δ_{rms} die Beiträge der Schleifen berücksichtigen. Die Schichtdicke eines adsorbierten Polymers ist abhängig von vielen Einflussgrößen wie zum Beispiel der adsorbierten Menge, der Konzentration der Lösung und dem Lösungsmittel. Wird jedoch die Konzentration der Lösung konstant gehalten, ist die hydrodynamische Schichtdicke abhängig vom Molekulargewicht des eingesetzten Polymers. FLEER et al. verglichen die experimentellen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die die Schichtdicke von adsorbiertem PEO auf Silika, Cellulose-Acetat und PS-Latices bestimmt haben. Auf Silika und Cellulose-Acetat ist die Schichtdicke proportional zu $M^{0,44}$, aus bisher noch nicht bekannten Gründen ist die Schichtdicke auf den PS-Latices jedoch proportional zu $M^{0,7}$. Die unterschiedlichen Definitionen der Schichtdicken δ_h und δ_{rms} erklären, weshalb sowohl die theoretischen Berechnungen nach der SCHEUTJENS-FLEER-Theorie als auch die experimentellen Ergebnisse für die Adsorption von PEO auf PS zeigen, dass $\delta_h \sim M^{0,7}$ ist, hingegen $\delta_{rms} \sim M^{0,4}$. Da bei der Adsorption von PEO auf anderen Substraten jedoch eine

andere Abhängigkeit festgestellt wurde, sind die bisher beschriebenen Proportionalitäten unter Umständen aber nicht verallgemeinerbar. Für die Adsorption des Copolymers Poly(vinylalkohol-co-vinylacetat) auf PS-Latex fanden GARVEY et al. eine Abhängigkeit der Schichtdicke von $M^{1,14}$. FLEER et al. schlagen jedoch vor, den ersten Messpunkt zu vernachlässigen, so dass sich eine Abhängigkeit von $M^{0,8}$ ergibt, die dem Ergebnis bei Homopolymeren entspricht und besser zu den theoretischen Vorhersagen passt.^[59] Es zeigt sich also, dass sowohl bei der Anbindung von Polymeren über mehrere Bindungsstellen als auch bei der Adsorption eine Proportionalität zum Molekulargewicht vorliegt, auf die genaue Abhängigkeit scheinen jedoch noch weitere Faktoren Einfluss zu haben.

3.1.2 Funktionelle Gruppen zur Anbindung an eine Oberfläche

Zur dauerhaften Anbindung der Polymere an eine Oberfläche gibt es verschiedene funktionelle Gruppen, die in der Lage sind, kovalente Bindungen mit einer Substratoberfläche einzugehen. Im Folgenden werden daher die Vor- und Nachteile von Silanen, Sulfiden, DOPA/Dopamin und Phosphonsäuren/Phosphonsäureestern kurz erläutert.

Silane

Silane werden seit den 60er Jahren zur Oberflächenmodifizierung für vielfältige Zwecke, beispielsweise zur Vermeidung von Korrosion^[63] und als Haftvermittler zwischen Polymeren und anorganischen Materialien,^[64] eingesetzt. Dabei stand zunächst die Modifizierung von Silizium und Glas im Vordergrund, seit jedoch die Beschichtung von Implantaten an Bedeutung gewonnen hat, werden auch verschiedene Metalle aus dem medizinischen Bereich wie beispielsweise Titan,^[7] Cobalt-Chrom-Molybdän^[65] und Edelstahl^[66] mit Hilfe von Silanen modifiziert. Zu diesem Zweck werden zumeist Chlor- oder Alkoxysilane verwendet.^[67] Der Mechanismus der Anbindung der Silane wurde in erster Linie auf SiO₂-haltigen Oberflächen untersucht und wird daher im Folgenden näher betrachtet. Die auf der SiO₂-Oberfläche vorhandenen Hydroxygruppen treten in Konkurrenz zu der etwa 10-15 Å dünnen Wasserschicht, die sich normalerweise auf der Oberfläche befindet, so dass üblicherweise mehrere Reaktionen gleichzeitig ablaufen.^[68] Die Reaktion mit Wasser führt zunächst zu einer Hydrolyse des Trichloralkylsilans, mit weiteren Molekülen kommt es dann zu einer Polymerisation. Das Produkt ist jedoch nur über Wasserstoff-Brücken-Bindungen an die Oberfläche gebunden. Reagiert das Trichloralkylsilan mit einer der Silanolgruppen der Oberfläche, entsteht eine kovalente Bindung an die Oberfläche. Die verbleibenden Si-Cl-Gruppen werden hydrolysiert und können dann weitere Moleküle binden.^[68] Dabei entsteht

also keine Monoschicht aus langkettigen Molekülen wie es von Thiolen auf Gold^[67] bekannt ist, sondern ein Polymer, dass auf Grund von nur wenigen Verknüpfungen mit der Oberfläche in der Lage ist, kleinere Unebenheiten auszugleichen.^[69] Die Anbindung von Silanen an die Oberfläche ist jedoch durch die für die Reaktion notwendigen Hydroxygruppen limitiert,^[23] außerdem ist bei vielen Oberflächen, beispielsweise Titan^[7] oder Edelstahl,^[70] zunächst eine Aktivierung der Oberfläche erforderlich.

Sulfide

Eine der ersten Arbeiten zur Herstellung von selbstorganisierenden Monoschichten aus Dialkyldisulfiden auf Gold wurde 1983 von NUZZO et al. veröffentlicht.^[71] Neben den Dialkyldisulfiden gibt es noch viele weitere oberflächenaktive Schwefelverbindungen,^[72] die am häufigsten eingesetzt sind Alkanthiole, die in einer oxidativen Addition mit der Gold-Oberfläche reagieren und abschließend Wasserstoff reduktiv eliminiert wird.^[72] Monoschichten auf Gold sind hoch geordnet und dicht gepackt,^[73] da wiederholte Adsorptions/Desorptionsprozesse dazu beitragen, Defekte auszugleichen.^[72] Die Anwendbarkeit von Thiolen ist jedoch limitiert, bisher gibt es nur sehr wenige Studien zur Anbindung von Polymeren mit Hilfe von Thiolen. In den meisten Fällen geschieht dies über ein *grafting from*-Verfahren, indem eine auf Thiolen basierende Monoschicht als Anker für eine Polymerisation verwendet wird.^[74, 75] Als Gegenbeispiel zeigten STOUFFER et al., dass mit einer Thiol-Gruppe endfunktionalisiertes PS spontan auf Gold adsorbiert^[76] und NAKAYAMA et al., dass ein Thiol-derivatisierter Polyvinylalkohol in der Lage ist, Hydrogelschichten auf Gold auszubilden.^[77]

DOPA/Dopamin

Im Vergleich zu den Sulfiden und Silanen ist die Catechol-basierte Bindung an Oberflächen und speziell Metalle noch nicht so lange bekannt. Die außergewöhnliche Fähigkeit der Miesmuscheln, selbst in feuchter Umgebung an beliebigen organischen und anorganischen Materialien zu adhären, veranlasste Wissenschaftler, diesem Phänomen auf den Grund zu gehen. 1980 wurde 2,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA) als Bestandteil der Adhäsionsproteine von *Mytilus edulis* (Miesmuscheln) identifiziert.^[78] Der Bindungsmechanismus dieser ungewöhnlich starken und dennoch vollkommen reversiblen Bindung an Metalloxide ist bislang noch unbekannt.^[79] Dennoch wurde DOPA und strukturell ähnliche Moleküle wie Dopamin in zahlreichen Studien zur Modifizierung von Oberflächen verwendet. FAN et al. verwenden Dopamin beispielsweise als biomimetischen Anker für die

ATRP (*atom transfer radical polymerisation*) von Poly(ethylenglykol)methacrylat auf Titan und rostfreiem Stahl.^[80] Durch die Verwendung von DOPA in Triblock-Copolymeren mit UV-vernetzbaaren Doppelbindungen können Hydrogele hergestellt werden, die in der Lage sind, an Titan zu binden.^[81] Nicht zuletzt können mit dieser Methode Proteine an Oberflächen gebunden werden. Entweder, indem beispielsweise Carboxymethylchitosan mit Hilfe von Dopamin an die Oberfläche gebunden wird und nach Aktivierung mit EDC kovalent BMP2 bindet,^[82] oder direkt über die Chinongruppen, die bei der Polymerisation von Dopamin in alkalischen Medien entstehen und die reaktiv gegenüber Aminen und Thiolen sind.^[83] Der Vorteil von DOPA/Dopamin ist der Einsatz vieler verschiedener Materialien ohne die Oberfläche vorbehandeln zu müssen.^[83] Die Bindung an die Oberfläche ist jedoch empfindlich gegenüber hohen pH-Werten. Durch die Oxidation der Catechol- zu Chinongruppen, die besonders bei hohen pH-Werten beschleunigt wird, sinkt die Adhäsionskraft drastisch und es können außerdem unerwünschte Vernetzungen entstehen.^[84]

Phosphonsäuren und Phosphonsäureester

Ebenfalls erst im letzten Jahrzehnt gewannen phosphorhaltige Substanzen zur Oberflächenmodifizierung an Bedeutung, obwohl die ersten Untersuchungen zur Anbindung von Phosphaten auf Oberflächen bereits 1984 durchgeführt wurden.^[85] Alkylphosphonsäuren binden an die Oxid-Oberfläche von Titan und dessen Legierungen,^[86-88] Eisen,^[89] Stahl,^[90, 91] Aluminium,^[90, 92] Kupfer^[90, 93] und Glimmer^[94]. Die oberflächenaktiven Substanzen sind dabei nicht nur auf Phosphonsäuren und deren Ester^[95, 96] beschränkt, Alkylphosphate^[97] und Phosphinate^[95] reagieren ebenfalls mit der Oxidschicht. Zunächst wurden die Monoschichten nur durch Adsorption aus einer Lösung hergestellt,^[86] es konnte jedoch bewiesen werden, dass ein anschließender Temperprozess die Stabilität der Filme erhöht.^[87, 98] Die Art der Wechselwirkung variiert je nach Oberfläche: Untersuchungen zeigen, dass sowohl eine monodentate^[88, 99] als auch bi-^[91, 100] und tridentate^[98, 100] Anbindung möglich ist. Die Charakterisierung erfolgte dabei in den meisten Fällen mittels IR-Spektroskopie oder XPS, daneben gibt es jedoch noch verschiedene NMR-Techniken,^[101, 102] die dazu eingesetzt werden können. Zur Bestimmung der Art der Bindung werden bei der IR-Spektroskopie die P=O-, P-O- und P-OH- Schwingungen der Filme mit denen der reinen Substanz verglichen. RAMAN et al. interpretieren das Verschwinden der P-OH-Schwingung von Octadecylphosphonsäure auf Stahl bei Erhalt der P-O- und P=O-Schwingung als bidentate Anbindung.^[91] In den XPS-Spektren wird ebenfalls das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein bestimmter Peaks zur Aufklärung verwendet, zusätzlich gibt jedoch das Verhältnis der

Sauerstoffpeaks, die den P-O-Ti- beziehungsweise P=O- und den P-OH-Bindungen zugeordnet werden können, Aufschluss über den Bindungsstatus. Einer Phosphonsäure wird somit ein Verhältnis von 0,5 zugeordnet, da sie eine P=O-Bindung und zwei P-OH-Bindungen besitzt.^[103] Im anderen Extremfall einer tridentaten Anbindung gäbe es drei P-O-Ti-Bindungen und keine P-OH-Bindung, das Verhältnis wäre somit 3.^[99] Dazu dürfen jedoch keine Störfaktoren vorhanden sein, für die XPS-Spektren bedeutet dies keine zusätzlichen Sauerstoffe im Molekül und im IR keine Überlappungen von Peaks wie sie beispielsweise bei denen von P-OH und TiO₂ auftreten.^[101] Zur Erklärung des Bildungsmechanismus der Phosphonat-Bindung zur Oberfläche gibt es in der Literatur zwei unterschiedliche Ansätze. Im nicht getemperten Film sind die Phosphonsäure-Moleküle zunächst über Wasserstoffbrücken an die Oberfläche und die Nachbarmoleküle gebunden,^[101] wobei die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen stärker sind als die Substrat-Molekülwechselwirkungen. Durch den Temperprozess wird die Phosphonsäure in ein Phosphonat überführt, das stark an die Oberfläche gebunden ist,^[98] so dass die von GAWALT et al. beobachtete Stabilität nach dem Tempern^[87] erklärt wird. Eine weitere Erklärung beruht auf einer Art Säure-Base-Reaktion in Form von Koordination und Kondensation an die oberflächengebundenen Hydroxy-Gruppen und μ -oxo-Sauerstoffe.^[88, 95, 104] Der von SCHWARTZ et al. vorgeschlagene Mechanismus in Abbildung 6 erklärt außerdem, weshalb die Konzentration von Hydroxygruppen an der Oberfläche für die Anbindung von Phosphonaten nicht limitierend ist. Im Gegensatz zur Silanisierung werden bei der Phosphonat-Reaktion die Hydroxygruppen nicht verbraucht, sondern nach Koordination des Phosphonats an das Titan durch die Öffnung einer μ -Oxo-Funktion eine neue Hydroxygruppe erzeugt, so dass die Anbindung fortgesetzt werden kann.

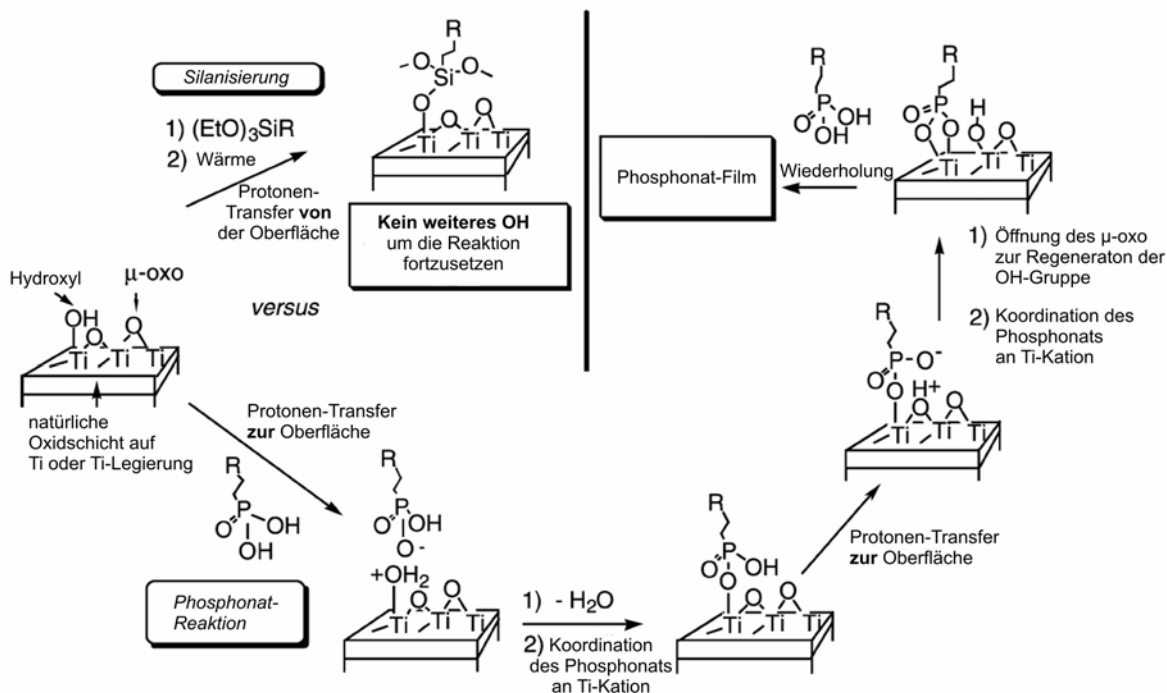


Abbildung 6: Von SCHWARTZ et al. postulierter Mechanismus zur Anbindung der Phosphonate^[104]

Phosphorhaltige Substanzen werden sowohl zur Herstellung von Monoschichten als auch zur Anbindung von Polymeren auf Metalloberflächen verwendet. SCHWARTZ et al. modifizierten Ti6Al4V mit einer Monoschicht aus Alkylphosphonaten, an die anschließend RGD gebunden wurde und konnten zeigen, dass die Proliferation von Osteoblasten im Vergleich zu den unmodifizierten Oberflächen stark erhöht war.^[104] Der Einsatz der Photoelektronenspektroskopie erlaubte ADDEN et al. die detaillierte Charakterisierung von Alkylphosphonsäureschichten auf Ti6Al4V und deren Aktivierung, so dass die Anbindung von BMP2 erfolgreich durchgeführt werden konnte.^[105] Phosphonsäuregruppen können aber auch in Polymere eingebaut werden und dienen dann zur Anbindung von modifizierten Poly-Styrol-Nanopartikeln^[106] oder Carboxymethylcellulose^[107] auf Titan, um die Eigenschaften eines Implantats zu verbessern.

3.2 Immobilisierte Proteine in der Medizin

Den kontinuierlichen Weiterentwicklungen in der Biotechnologie ist es zu verdanken, dass Proteine und Enzyme in einer stetig wachsenden Zahl von Einsatzgebieten Anwendung finden. In der industriellen Produktion werden Enzyme beispielsweise zur Herstellung von Zuckern oder zur Sterilisation von Milchprodukten verwendet.^[108] Aber auch im medizinischen Bereich findet sich ein breit gefächertes Anwendungsspektrum. In der Diagnostik werden Enzyme für analytische Bioassays^[109] eingesetzt, beispielsweise zur

Analyse der DNA.^[110] Ebenso steigt der Einsatz von Proteinen zur Behandlung von Krankheiten. Dabei werden die Proteine/Enzyme zum einen verwendet, um intra- oder extrakorporal Toxine oder Antikörper zu entfernen.^[108] Zum anderen werden die Proteine seit den 80ern selbst als Medikament eingesetzt,^[111] da sie den Vorteil eines spezifischen Mechanismus besitzen und somit sehr wirksam sind.^[112] Zur Initialisierung und Aufrechterhaltung eines therapeutisch wirksamen Proteinlevels wären täglich mehrere Injektionen notwendig. Um dies zu vermeiden, ist eine Applikationsmethode, die eine kontrollierte Freisetzung des Proteins erlaubt, sinnvoll. Einerseits wird so das Protein vor der Zersetzung und dem Ausscheiden aus dem Körper geschützt, andererseits kann durch die gezielte Injektion eines Reservoirs an den Wirkungsort und der Verbleib an demselben eine systemische Verteilung sowie nachteilige Effekte vermieden werden.^[113]

Unabhängig davon, ob Proteine kovalent gebunden oder in einem Netzwerk eingeschlossen werden, um im Laufe der Zeit freigesetzt zu werden, gelten für den Träger und das Immobilisierungsverfahren besondere Anforderungen. In jedem Fall ist es wichtig, die Erhaltung der biologischen Aktivität im Rahmen einer akzeptablen Haltbarkeit zu garantieren. Da diese leicht durch physikalische und chemische Instabilitäten beeinträchtigt werden kann, ist es für das Design eines Drug-Delivery-Systems entscheidend, die physikochemischen und biologischen Eigenschaften wie Molekülgröße, Löslichkeit, Stabilität, biologische Halbwertszeit, Immunogenität sowie den Dosisbedarf zu berücksichtigen.^[113]

Bone Morphogenetic Proteins

Bereits 1965 konnte URIST in verschiedenen Experimenten am Tier zeigen, dass die Implantation von demineralisierten Knochenfragmenten sowohl zur Knochenregeneration als auch zum Wachstum von Knochen im Weichgewebe beiträgt.^[114] Die beobachteten Vorgänge entsprechen der embryonischen Knochenbildung und der post-natalen endochondralen^{IX} Verknöcherung.^[115] Zu dem ablaufenden Mechanismus wurde postuliert, dass es in dem Knochen Substanzen gibt, die pluripotente mesenchymale Stammzellen^X anziehen und zur Knochenbildung anregen. Diese wurden als *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) bezeichnet. JOHNSON erkannte bereits 1988 das klinische Potential der BMPs.^[37] Zur Behandlung von nichtverheilenden Frakturen und Defektstellen im Knochen applizierte er aufgereinigtes humanes BMP entweder in Kombination mit allogenen^[38] oder autogenen^[37] Knochenmaterial oder einem Polymilchsäure/Polyglykolsäure-Streifen^[36] und einer

^{IX} endochondral: im Knorpel liegend

^X pluripotente mesenchymale Stammzellen: Vorläuferzellen des Stütz- und Bindegewebes, die zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen eines Organismus angeregt werden können.

zusätzlichen externen Fixierung. Bei fast allen Patienten konnte eine Heilung beobachtet werden, jedoch blieb unklar, ob der Effekt tatsächlich dem BMP zuzuschreiben ist. Festzustellen bleibt aber, dass das BMP an orthotopen^{XI} Stellen gut toleriert wurde.^[38] Zur selben Zeit wurde auch an der Aufklärung der Struktur gearbeitet und nach der intensiven Aufreinigung von Rinderknochen konnte ein Protein isoliert und dessen Aminosäuresequenz bestimmt werden, das die bereits bekannte Wirkung zeigte.^[33] Heutzutage sind 15 BMPs bekannt,^[115] die zur TGF- β -Superfamilie gehören und im Wesentlichen durch ihre Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und Bindegewebe zu initiieren, charakterisiert werden.^[48] BMP2, ein Dimer mit einem Gewicht von etwa 26 kDa,^[116] wird als der Wachstumsfaktor mit dem höchsten osteoinduktiven Potential angesehen.^[117] Die rekombinant hergestellten BMPs werden zur Unterscheidung von den endogenen^{XII} BMPs als rhBMPs bezeichnet. Im Folgenden wird der Vorgehensweise in der Literatur folgend die allgemeine Bezeichnung BMP verwendet, auch wenn in den meisten Fällen rekombinant hergestelltes BMP gemeint ist.

Es wurden bisher bereits verschiedene Signalkaskaden der Wachstumsfaktoren aufgedeckt,^[118, 119] jedoch ist noch unklar, wie die im menschlichen Körper vorkommenden Wachstumsfaktoren miteinander in Wechselwirkung treten, um die Heilung eines Knochens zu bewirken.^[120] Abbildung 7 zeigt eine stark vereinfachte Darstellung der zentralen Signalwege. Wie alle Mitglieder der TGF-beta Superfamilie wirken auch die BMPs über die Reaktion mit zwei Typen von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche befinden.^[48] Das BMP bindet an den extrazellulären Teil der Rezeptoren, woraufhin der interzelluläre Teil die Signalkaskade zur Beeinflussung der Differenzierung der Zellen initiiert.^[120] An der Zelle befinden sich Rezeptoren des Typ I und Typ II in unmittelbarer Nähe, so dass das BMP an beide gleichzeitig bindet (siehe Abbildung 7). Dabei erfolgt zunächst die Bindung über den Typ II Rezeptor, anschließend wird Typ I ergänzend hinzugefügt, so dass ein heterotetramerer Komplex aus zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoren entsteht.^[48]

^{XI} orthotop: am normalen Ort im Körper befindlich

^{XII} endogen: wird im Körper gebildet

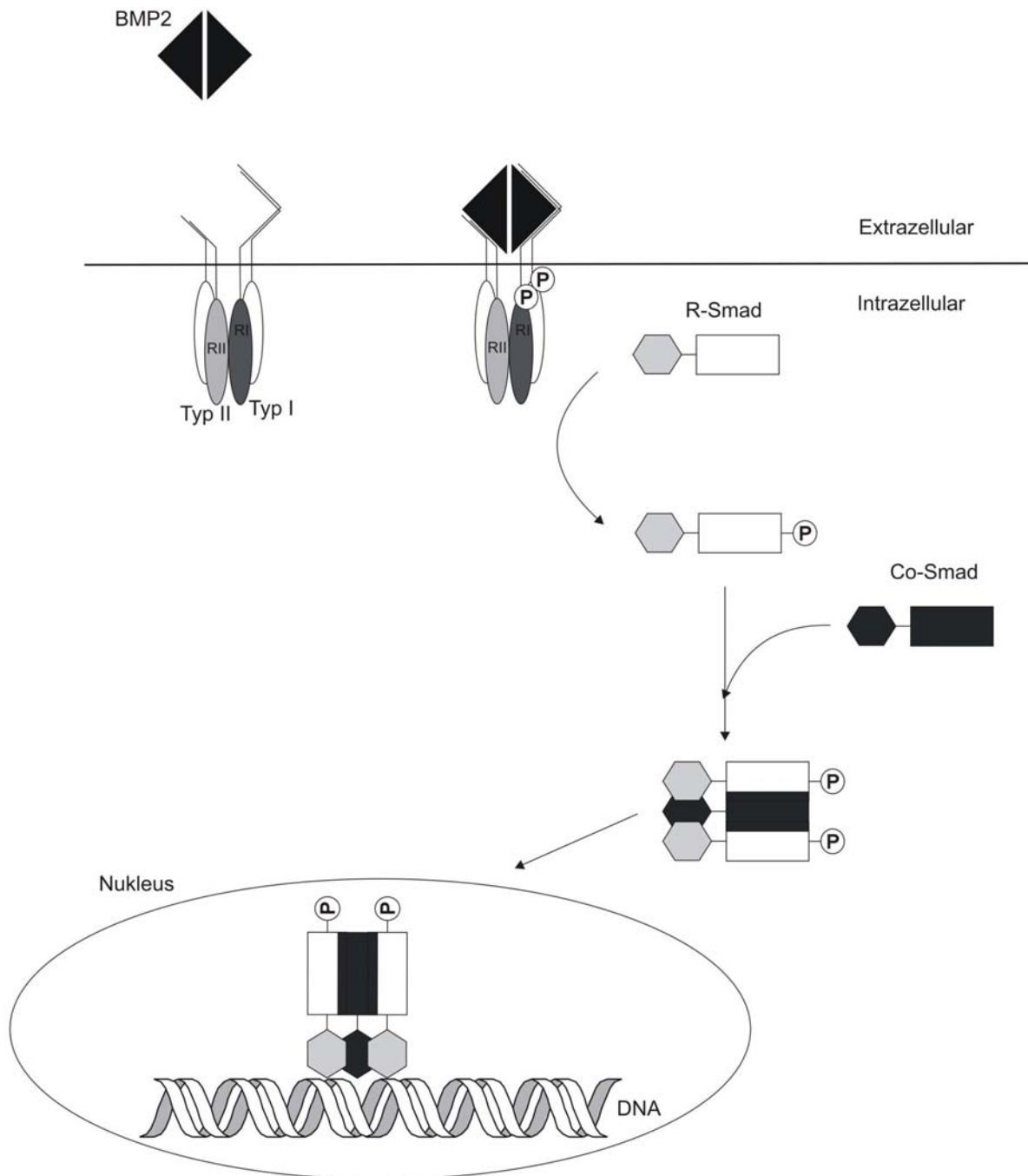


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Signalkaskade von BMP^[48, 118, 119, 121, 122]

Innerhalb dieses Komplexes werden die Typ I Rezeptoren durch Typ II transphosphoryliert. Der derartig aktivierte Typ I Rezeptor initiiert anschließend die intrazellulären Signale, indem R-SMADs^{XIII} phosphoryliert werden.^[121] Diese bilden mit weiteren SMAD-Proteinen aus dem Zellinneren einen bis zu hexameren Komplex, der an die DNA bindet und so an der Gen-Regulierung teilnimmt.^[120] Auf diese Weise kann die Expression spezifischer Gene induziert beziehungsweise reguliert werden, welche die Charakteristika der Zelle verändern.^[120]

^{XIII} SMADs sind intrazelluläre Proteine, die bei der Anbindung an die extrazellulären TGF- β Liganden aktiviert werden und das Signal zum Nukleus weiterleiten.^[48]

So wird die Differenzierung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten und Chondrozyten^{XIV} angeregt und gleichzeitig die Differenzierung in andere Zellen, beispielsweise Myoblasten,^{XV} unterbunden, was die Bildung von Knochen auch außerhalb von bereits vorhandenem Knochengewebe, das heißt an ektopischen Stellen, ermöglicht.^[121]

Immobilisierung von BMPs

Infolge ihrer osteoinduktiven Eigenschaften werden BMPs daher zur Knochenregeneration bei Brüchen oder Defekten in kritischer Größe eingesetzt, indem sie zumeist direkt an die entsprechende Stelle injiziert werden.^[123, 124] BMP2 ist jedoch leicht löslich und wird von den Körperflüssigkeiten vom Anwendungsort abtransportiert,^[48] so dass die lokale Konzentration sehr stark verringert wird. Daher ist es bislang notwendig und üblich, BMP2 in sehr hohen Dosen einzusetzen.^[125] Obwohl das BMP2 ein körpereigenes Protein ist, kann die Gabe einer derartigen Überdosis jedoch schwerwiegende Folgen haben. Neben Hautrötungen können Ödeme im Weichgewebe oder lokale Entzündungen entstehen, außerdem ist eine heterotopie Ossifikation, das heißt eine Knochenbildung im Weichgewebe, möglich.^[126] In einigen Fällen wurde sogar von einer Aktivierung der Osteoklasten, die zu einem Knochenabbau geführt hat, berichtet.^[127-131] Um diese Nebenwirkungen zu vermeiden, ist es notwendig, ein entsprechendes Drug Delivery System zu entwickeln. TABRIZIAN hat die Anforderungen an ein solches folgendermaßen zusammengefasst:^[126]

- Biokompatibilität, vorhersagbare Biodegradabilität, geringe Immunogenität und Antigenität
- Förderung der zellulären Vaskularisierung und Anlagerung
- Affinität zu BMP und Knochen
- Erhaltung beziehungsweise Förderung der Bioaktivität von BMP
- Leichte Formbarkeit/Verarbeitung und Herstellung
- Sicherheit, Stabilität, Zugänglichkeit und Kosten-Effektivität
- Zulassung durch Regulationsbehörden

WOZNEY^[39] und SCHMIDTMAIER^[132] forderten außerdem, dass ein idealer BMP-Träger osteoinduktiv und osteokonduktiv sein sollte, das heißt, dass undifferenzierte pluripotente Zellen dazu angeregt werden, sich zu knochenbildenden Zellen zu entwickeln und dass die Oberfläche des Trägers ein Knochenwachstum darauf oder im Falle eines porösen Trägers in

^{XIV} Chondrozyten: Knorpelzellen

^{XV} Myoblast: Vorläufer von Muskelzellen

die Poren hinein erlauben sollte.^[133] Nur wenn die Implantate eine Osteoinduktion und Osteokonduktion zulassen, ist auch eine erfolgreiche Osseointegration des Implantats möglich.^[133] Osseointegration wird zunächst als direkter Kontakt zwischen Implantat und Knochen definiert, je nach Charakterisierungsmethode (histologisch oder biomechanisch) existieren dann noch detailliertere Formulierungen.^[133] In jedem Fall impliziert der Begriff Osseointegration aber eine dauerhafte Verankerung des Implantats im Knochen.^[133]

Es gibt eine Vielzahl von Trägermaterialien, die zur Immobilisierung von BMP entwickelt und auch bereits *in vivo* getestet wurden. Generell kann eine Unterteilung in vier Kategorien stattfinden, wie sie in Tabelle 1 gezeigt ist.

Tabelle 1: Hauptklassen von Trägermaterialien und ausgewählte Tierexperimente mit BMP-DDS ^[134]

<i>Trägermaterial</i>	<i>Vorteile</i>	<i>Nachteile</i>	<i>Typen</i>	<i>BMP/Material/Tiermodell</i>	<i>Referenzen</i>
Natürliche Polymere	biokompatibel, biodegradabel, löslich in physiologischen Flüssigkeiten mit natürlicher Affinität zu BMP	Immunogenität, Überträger von Pathogenen, Schwierigkeiten bei der Sterilisation	Collagen (Gele, Nanofasern, Scaffolds, Filme) Fibrinkleber, Alginate, Chitosan	BMP-2/Gelatin-Hydrogel/ Kaninchenelle BMP-2/Chitosan/ Rattenunterkiefer	[40] [135] [136]
Anorganische Materialien	knochenähnlich degradabel/nicht-degradabel, osteokonduktiv, selbst-abbindend in vivo und mit Affinität zu BMP	spröde, schwer formbar, einige CPC sind exotherm	CPC, bioaktives Glas, Hydroxyapatit, Hyaluronsäure, Tricalciumphosphate, Metalle, Keramiken, Calciumsulfate	BMP-2/Hyaluron-Säure/ Wirbelsäule BMP-2/CPC in ACS/Affe- Wirbelsäule BMP-2/CPC-Kitt/Rattenschädel	[137] [138] [139]
Synthetische Polymere	exzellente chemische und mechanische Eigenschaften, einfach zu verarbeiten und zu sterilisieren, flexibel anpassbar und reproduzierbar	inflammatorische Antwort, lokaler pH-Wert-Abfall auf Grund von sauren Nebenprodukten und limitierte biologische Funktion	Polymere von α -Hydroxyestern wie PLA, PGA und Copolymere dieser zwei (PLGA)	BMP-2/PLGA Mikropartikel/ Rattenschädel BMP-2/PLA-DX-PEG injizierbare PLA-PEG/Maus/ Kiefer	[140] [141] [142]
Komposite	abhängig von der Kombination der verschiedenen Material- und Biomolekül-Klassen	komplexer Herstellungsprozess	Collagen-HA und Titan- PLLA	BMP-2/Collagen-PLG- Alginat/Ratten-Schädeldecke BMP-7/PLGA-PLLA-Scaffold/ Ratte subkutan BMP-7/Liposome in einem LbL- Verfahren mit Alginat und Chitosan beschichtet/Kaninchen- Tibia	[143] [144] [145]

Collagen beispielsweise ist ein natürliches Polymer, welches auf Grund seiner leichten Verarbeitbarkeit in vielen Fällen als Trägermaterial eingesetzt wird und in verschiedenen Formen bereits Eingang in klinische Studien gefunden hat.^[134] Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits kleine Änderungen bei pH-Werten oder dem Vernetzungsgrad einen Einfluss auf die Menge an gebundenem BMP besitzen.^[146] Des Weiteren stellt sich das Problem der Herkunft: Collagene werden aus Rinder- und Schweinehaut gewonnen und die Bildung von Antikörpern beim Empfänger ist nicht ausgeschlossen.^[147]

Vertreter der anorganischen Materialien sind Calciumphosphate, für die beispielsweise gezeigt werden konnte, dass bei einer Beschichtung eines Titanimplantats mit einem Gemisch aus Calciumphosphat und BMP2 geringere Dosen an BMP2 im Vergleich zu mit BMP2 getränktem Collagenschwamm benötigt werden.^[148] Nachteile wie eine verringerte mechanische Stabilität im Vergleich zum Knochen^[39] erschweren jedoch den Einsatz.

Synthetische biodegradable Polymerträger zeigen nicht das Problem der Immunogenität oder der Übertragung von Krankheiten und sind überdies leicht in verschiedene Formen zu bringen. Bei der Zersetzung der häufig verwendeten Polymere Polymilchsäure (PLA) und Polyglykolsäure (PGA) entstehen jedoch saure Nebenprodukte, die ein lokales Absinken des pH-Werts zur Folge haben. Dies kann zum einen eine inflammatorische Reaktion hervorrufen, zum anderen kann dadurch auch die Aktivität des immobilisierten Proteins beeinträchtigt werden.^[149]

An diesen Beispielen zeigt sich, dass die vorhandenen Systeme sowohl Vor- als auch Nachteile haben und weitere Entwicklungen notwendig sind, da sich das Anwendungsspektrum in Zukunft noch vergrößern wird.

Modifizierung von Implantaten mit BMP

Während zur Heilung von Frakturen eine Fixierung mit metallischen Hilfsmitteln nur kurzfristig eingesetzt wird und ein Einwachsen der Nägel im Normalfall nicht erwünscht ist, sieht es bei dauerhaften Implantaten ganz anders aus. Die Metalle für den Einsatz als Implantat werden hauptsächlich auf Grund ihrer mechanischen Stabilität ausgewählt, um einen Funktionserhalt, das heißt, eine möglichst schmerzfreie Beweglichkeit der Patienten, zu garantieren. Dabei wird natürlich auf eine entsprechende Biokompatibilität geachtet, jedoch wird im klinischen Alltag der Kontakt zwischen Implantat und Knochen auf mikroskopischer Ebene nur in wenigen Fällen berücksichtigt beziehungsweise beeinflusst. Im Jahr 2004 war bei 11,4 % der Patienten mit einem künstlichen Hüftgelenk eine Revisionsoperation notwendig,^[9] der Hauptgrund dafür war die aseptische Lockerung des Implantats. Ebenso

können osteoporöse Veränderungen, Beschädigung des Knochens durch Bestrahlung oder ein starkes Trauma die Qualität des Knochens verschlechtern.^[150] Die Fixierung eines Implantates in einem derart vorbelasteten Knochen stellt die Chirurgen vor eine große Herausforderung. Es ist jedoch bereits vielfach postuliert, dass die Wechselwirkungen an der Knochen-Implantat-Grenzfläche eine entscheidende Rolle bei der Osseointegration von Implantaten spielen.^[15, 43] Der ingenieurwissenschaftliche Ansatz zur Vergrößerung der Kontaktfläche beruht auf einer Erhöhung der Rauigkeit und dem Einbringen einer Mikrostruktur. Insbesondere jedoch, wenn die Qualität des Knochens auf Grund von Alter oder Krankheit vermindert ist, ist eine Aktivierung des Knochenwachstums zwecks eines besseren Einwachsens des Implantats vorteilhaft.^[15] An dieser Stelle ist daher der Einsatz von BMP2, welches das Knochenwachstum fördert und somit den Kontakt zwischen Knochen und Implantat verbessert, vielversprechend. Weiterhin wird erwartet, dass auf diese Art die Lebensdauer der Implantate erhöht wird. Eine Absenkung der Zahl der Revisionsoperationen hat zudem nicht nur positive Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten, sondern ist auch aus dem ökonomischen Blickwinkel betrachtet interessant.

In verschiedenen Tierversuchen wurde bereits bewiesen, dass die Verwendung von BMP die Osseointegration des Implantates verbessert. Bei der Implantation von Schrauben in den Kiefer von Hunden wurde vor dem Einsetzen der Schrauben eine Lösung aus BMP und Atelozeptid Typ-I Collagen in das Bohrloch gegeben. Histologische Untersuchungen zeigen, dass bei diesen Implantaten nach 3 Wochen eine Knochenneubildung in direktem Kontakt zum Implantat stattgefunden hat, wohingegen bei denen ohne BMP kein Kontakt festzustellen ist. Nach 12 Wochen hingegen ist kein Unterschied mehr festzustellen, so dass in diesem Fall das BMP eine Beschleunigung der Heilung bewirkt hat.^[151] In einer weiteren Studie wurde vor der Implantation von Hüftgelenken in Hunde eine Mischung aus Calciumphosphat-Zement und BMP auf die Implantate gegeben sowie in einen zusätzlich erzeugten Defekt hinter der Hüftgelenkspfanne.^[14] Die mit BMP2 behandelten Hunde zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine komplette Ausfüllung des Defekts mit Knochen, der in seiner Dichte und Struktur dem umliegenden Knochen ähnelt. Histologische Untersuchungen weisen aber daraufhin, dass die Knochenbildung nach 12 Wochen noch nicht abgeschlossen ist; da jedoch keine längeren Versuchszeiten gewählt wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob danach noch eine weitere Knochenbildung stattfindet. Die kovalente Immobilisierung über einen Silan-Anker und dessen Aktivierung mittels CDI zur Anbindung von BMP2 zeigt ebenfalls sehr erfolgversprechende Ergebnisse. Nach 9 Wochen sind die Zylinder vollständig integriert und im Vergleich zur Negativ-Kontrolle kann ein signifikanter

Anstieg des Knochen-Implantat-Kontaktes nachgewiesen werden.^[152] In diesem Fall wurden 400 beziehungsweise 640 ng/cm² verwendet. Eine Untersuchung zur Dosisabhängigkeit wurde von SUMNER et al.^[128] durchgeführt, die jeweils 100, 400 und 800 µg BMP pro Implantat in einer Pufferlösung auf eine poröse HAP/TCP-Beschichtung aufbrachten und anschließend gefriertrockneten. Dabei wurde festgestellt, dass das Knochenwachstum in die poröse Beschichtung hinein bei der geringsten Dosis am stärksten ist. Das Volumen des neugebildeten Knochens an der 3 mm großen Lücke zwischen Implantat und Knochen war jedoch bei der höchsten Dosis an BMP am größten.^[128] Die Untersuchungen zeigen, dass bei der Verwendung von BMP auf Implantaten gute Erfolge erzielt werden können, aber bereits bei der Betrachtung dieser geringen Anzahl an Studien wird deutlich, dass die Wirkung stark von der Art der Immobilisierung des BMPs abhängig ist und weiterhin Bedarf an einem geeigneten Delivery System besteht.

Methoden zur Immobilisierung von BMP auf Implantaten

In der Literatur werden zur Immobilisierung von BMP auf Implantaten verschiedene Ansätze verfolgt, deren Materialien und Methoden vergleichbar mit denen sind, die bei der Immobilisierung von BMP zur Behandlung von Knochendefekten eingesetzt werden. Beispielsweise werden auch in diesem Fall natürliche biodegradable Polymere eingesetzt, die mit Hilfe von entsprechenden Verfahren auf die Implantatoberfläche aufgebracht werden. WANG und seine Mitarbeiter nutzen hierfür Dopamin, um Carboxymethylchitosan an die Titanoberfläche zu binden, welches nach anschließender Aktivierung mit EDC/NHS in der Lage ist, BMP zu binden.^[82]

Ebenso werden Schichten aus anorganischen biomimetischen Materialien verwendet, um BMP auf metallischen Implantaten zu immobilisieren. LIU et al. nutzen dabei Calciumphosphat-Schichten, in die während der Herstellung das BMP eingelagert wird.^[44] MOLLENHAUER hingegen lässt eine BMP-haltige Lösung auf Implantaten austrocknen, auf die mittels Plasma-Spraying ein industriell hergestelltes Hydroxylapatit aufgebracht wurde.^[46] Daneben gibt es noch weitere Methoden, die speziell auf die Oberflächenmodifizierung zugeschnitten sind. Einen eher biotechnologischen Ansatz verfolgt zum Beispiel SHIBA, der BMP mit einem speziellen Peptid-Aptamer, welches über elektrostatische Wechselwirkungen an Titan bindet, modifiziert hat.^[153]

Silane hingegen werden zur Oberflächenmodifizierung mit den verschiedensten Zielen, zum Beispiel Vermeidung von Korrosion^[63] oder als Haftvermittler zwischen Polymeren und anorganischen Partikeln,^[64] eingesetzt, finden jedoch auch immer häufiger Anwendung im

medizinischen Bereich. JENNISSEN stellt Beschichtungen aus einem Aminoalkylsilan auf Titan her, um nach einer Aktivierung mit CDI BMP2 anbinden zu können.^[154] Die Aktivierung mit CDI oder EDC/NHS ist ebenfalls bei Phosphonsäure-basierten Monoschichten auf Ti6Al4V möglich, so dass auf diesem Weg 4-6 ng BMP2 pro Quadratzentimeter immobilisiert werden konnten.^[105]

Die bisher beschriebenen Methoden verfolgen das konkrete Ziel, BMP auf Titan zu immobilisieren. Darüber hinaus gibt es natürlich noch weitere interessante Lösungsansätze, um Proteine zu immobilisieren, die mit den entsprechenden Modifikationen auf BMP und Titan übertragen werden können. Mit Hilfe eines p-Nitrophenylchloroformat-Aktivesters kann beispielsweise Trypsin über dessen Aminogruppen an die Oberfläche von Titan gebunden werden.^[155] Da jedes Protein freie Aminogruppen besitzt, ist es durchaus denkbar, diese Immobilisierungsmethode auf BMP zu übertragen, gegebenenfalls müssen die Reaktionsbedingungen wie beispielsweise das Puffersystem angepasst werden. Eine weitere interessante Methode ist die Einlagerung des BMPs in Polyelektrolyt-Multischichten. PICART verwendet Layer-by-Layer-Beschichtungen aus Poly-L-Lysin und Hyaluronan auf Glas oder Plastik-Wells, an beziehungsweise in denen BMP2 adsorbiert wird.^[156] Obwohl keine kovalente Bindung vorliegt, ist die Freisetzung des BMP2 so minimal, dass allein dadurch keine Produktion von alkalischer Phosphatase, einem Hinweis auf die Neubildung von Knochen, hervorgerufen wird. Daher wird die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen das eingelagerte BMP „spüren“, ohne dass der Film dazu abgebaut werden muss, oder sehr empfindlich gegenüber geringen Konzentrationen an BMP2 sind, die entstehen, wenn der Film direkt unterhalb der Zellen von zellulären Enzymen abgebaut wird. In einer weiteren Publikation^[157] konnte bereits gezeigt werden, dass die Herstellung von Polyelektrolyt-Multischichten aus Hyaluronsäure und Poly-L-Lysin auf Nickel-Titan-Legierungen möglich ist, so dass mit diesem System bereits eine vielversprechende Methode gefunden wurde.

3.3 Auswahl der Copolymersysteme zur Immobilisierung von BMP2

Im vorhergehenden Kapitel wurden die verschiedenen Lösungsansätze zur Immobilisierung von BMP2 auf Implantaten vorgestellt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines neuartigen Systems, dass die kovalente Anbindung von Proteinen auf Implantaten erlaubt. Dazu werden maßgeschneiderte Copolymere hergestellt, deren Monomerbausteine den folgenden Anforderungen entsprechen:

- Ein Monomer trägt eine funktionelle Gruppe zur kovalenten Anbindung des Proteins. Die dabei erforderlichen Reaktionsbedingungen haben keine oder nur geringe nachteilige Effekte auf die biologische Aktivität des Proteins.
- Das andere Monomer ist oberflächenaktiv, das heißt, es enthält eine funktionelle Gruppe, die in der Lage ist, eine stabile Bindung mit der Oberfläche des Implantats aus einer Titanlegierung einzugehen.

Im Folgenden werden nun verschiedene Möglichkeiten vorgestellt und diskutiert.

3.3.1 Methoden zur kovalenten Immobilisierung von Proteinen

Die Immobilisierung von Proteinen kann zum einen über physikalische Methoden wie elektrostatische, hydrophile/hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte erfolgen. Das Problem dabei ist jedoch die Instabilität der entsprechenden Wechselwirkungen. Infolgedessen werden die Proteine nicht am Applikationsort gehalten, sondern schließlich doch über den gesamten Körper verteilt. Bei physikalischen Wechselwirkungen besteht weiterhin die Gefahr der ungerichteten und über mehrere Punkte stattfindenden Anbindung, die auf Grund von Veränderungen in der Mikroumgebung und struktureller Deformation die biologische Aktivität der Proteine herabsenken können.^[158]

Chemische Methoden der Anbindung basieren auf starken kovalenten oder koordinativen Wechselwirkungen. Dafür werden teilweise drastische Reaktionsbedingungen benötigt, die zu einem deutlichen Verlust der Aktivität führen können. Ebenfalls kann durch die chemische Bindung die strukturelle Konfiguration beeinflusst und insbesondere bei Enzymen die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums verringert oder der optimale pH-Wert verschoben werden, so dass die Effizienz sinkt.^[158] Für eine kovalente Immobilisierung werden üblicherweise die Aminogruppen des Lysins, die Sulfhydrylgruppe des Cysteins, Carboxylgruppen von Aspartat und Glutamat sowie die Phenolgruppe von Tyrosin und die Imidazol-Funktion von Histidin verwendet.^[158]

Auf Grund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken mit anderen Cysteinen trägt die Cystein-Gruppe entscheidend zur Konformation und Stabilität der Proteine bei, wie das auch bei BMP2 der Fall ist. Die dort vorhandenen Cystein-Reste bilden zwei Cystin-Knoten, bestehend aus je drei Disulfidbrücken pro Monomer, die charakteristisch für die TGF- β -Superfamilie sind.^[159] Eine weitere Disulfidbrücke ist verantwortlich für die Ausbildung des Dimers. Die Sulfhydryl-Gruppen liegen somit nicht in ihrer freien Form vor und sind für die Immobilisierung nicht verwendbar. Am häufigsten werden die Aminogruppen des Lysins zur Immobilisierung eines Proteins genutzt, da diese typischerweise auf der Außenseite der

Proteine zu finden sind und gute Nukleophile darstellen.^[158] Weil sie jedoch in vielen Proteinen in großer Anzahl vorkommen,^[160] besteht die Gefahr der Anbindung über mehrere funktionelle Gruppen,^[158] welche die Flexibilität einschränkt und eine verringerte Aktivität zur Folge hat. Insbesondere bei der Immobilisierung von Enzymen zum Einsatz in der Katalyse wird jedoch ein *multipoint attachment* bevorzugt, welches das Protein zusätzlich stabilisiert.^[161, 162] Im vorliegenden Fall sollen zur Immobilisierung des BMP2s ebenfalls die Aminogruppen des Lysins genutzt werden.

Trotz der Risiken ist die kovalente Immobilisierung über Aminogruppen am verbreitetsten und durch die Vielzahl von Reaktionen, die sie eingehen können, vorteilhaft.^[160] Aus der Peptid-Synthese ist eine Reihe von funktionellen Gruppen bekannt, die zur Reaktion mit Aminen geeignet sind, beispielsweise Isothiocyanate und Isocyanate, Sulfonylchloride, Carbonate und Imidoester. Außerdem Aldehyde und Epoxide, die zu sekundären Aminen umgesetzt werden, sowie Acylazide, Anhydride, Carbodiimide, NHS-Ester und Fluorophenylester, die unter Ausbildung von stabilen Amidbindungen mit Aminen reagieren. Eine detaillierte Beschreibung der Reaktionswege und zu beachtenden Reaktionsbedingungen findet sich bei BODANSZKY^[163] und HERMANSON.^[164]

Beispiele aus der aktuellen Forschung zeigen jedoch, dass die Anwendung bestimmter funktioneller Gruppen vielversprechender zu sein scheint und auch weiter verbreitet ist als andere. Daher wird im Folgenden nur auf diese näher eingegangen.

Reaktion mit aktivierten Intermediaten

Eine beliebte Methode zur Erzeugung einer Amidbindung ist die Aminolyse von Estern. Da es im Gegensatz zu Anhydriden nur ein elektrophiles Zentrum gibt, entsteht bei dieser Reaktion auch nur ein Reaktionsprodukt, was das Verfahren zu einer eindeutigen Synthese macht. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen, werden aktivierte Ester, bei denen die Elektrophilie der Carbonylgruppe durch einen starken elektronenziehenden Effekt erhöht wurde, mit den bisher unveränderlichen Aminen umgesetzt.^[165]

Beispiele für solche Aktivester sind die halogenierten Phenylester und der N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester). Halogenierte Phenylester sind teilweise direkt käuflich erhältlich. Poly(pentafluorophenylacrylate) besitzen im Vergleich zu Poly(NHS)-Estern eine bessere Löslichkeit und eine höhere Reaktivität^[166] und können über die Reaktion mit Aminogruppen vielfältig funktionalisiert werden.^[167] Pentafluorophenylacrylat eignet sich außerdem zur Plasmapolymersation auf Oberflächen, so dass in einem einzelnen Schritt reaktive Filme erzeugt werden können, die in der Lage sind, Proteine zu binden.^[168] NHS-

Ester sind ebenfalls hochreaktiv und die Wasserlöslichkeit der Abgangsgruppe erleichtert zudem die Abtrennung vom Reaktionsprodukt.^[165] Die Erzeugung eines NHS-Esters aus Carbonsäuren unter Verwendung des Carbodiimids EDC und NHS ist eine annähernd universell anwendbare und daher oft eingesetzte Methode.^[164] EDLUND et al. aktivierten damit beispielsweise Acrylsäurefunktionen, die zuvor auf resorbierbare Träger aus PLLA und PCLA aufgebracht worden, um anschließend über einen Diaminspacer VEGF anzubinden.^[169] Zur Aktivierung von Hydroxygruppen von Polyethylenglykol-Spacern eignet sich der Einsatz von bifunktionellen Substanzen wie zum Beispiel Disuccinimidylcarbonat (DSC).^[170] Dabei entsteht unter Abspaltung von NHS zunächst ein Succinimidyl-Carbamat, welches mit dem Amin zu einem stabilen Urethan-Derivat reagiert. Um Hydrolyse zu vermeiden, ist es wichtig, die Reaktion in wasserfreien organischen Lösungsmitteln durchzuführen.^[164] LIU et al. konnten zeigen, dass im Fall einer Anbindung an einen PLG-Träger über einen NHS-aktivierten PEG-Spacer die biologische Aktivität von BMP2 erhalten bleibt.^[171] Einen ähnlichen bifunktionellen Aufbau wie DSC mit einer zentralen Carbonateinheit besitzt 1,1-Carbonyldiimidazol. Es ist in der Lage, sowohl Carbonsäuren als auch Hydroxygruppen zur Reaktion mit Aminen zu aktivieren. Die treibende Kraft bei der Reaktion mit Carbonsäuren zur Erzeugung des Intermediats ist die Freisetzung von Kohlendioxid und Imidazol.^[172] Mit Hydroxygruppen reagiert CDI wie in Abbildung 8 dargestellt zu einem Imidazol-Carbamat. Durch die anschließende Umsetzung mit einem Amin entsteht eine stabile Urethanbindung, da die Carbonylgruppe des CDIs im Reaktionsprodukt verbleibt.^[164] Bei der Umsetzung mit CDI ist auf die Verwendung von möglichst wasserfreien Lösungsmitteln zu achten, da CDI sehr leicht zu Imidazol und CO₂ hydrolysiert.^[164]

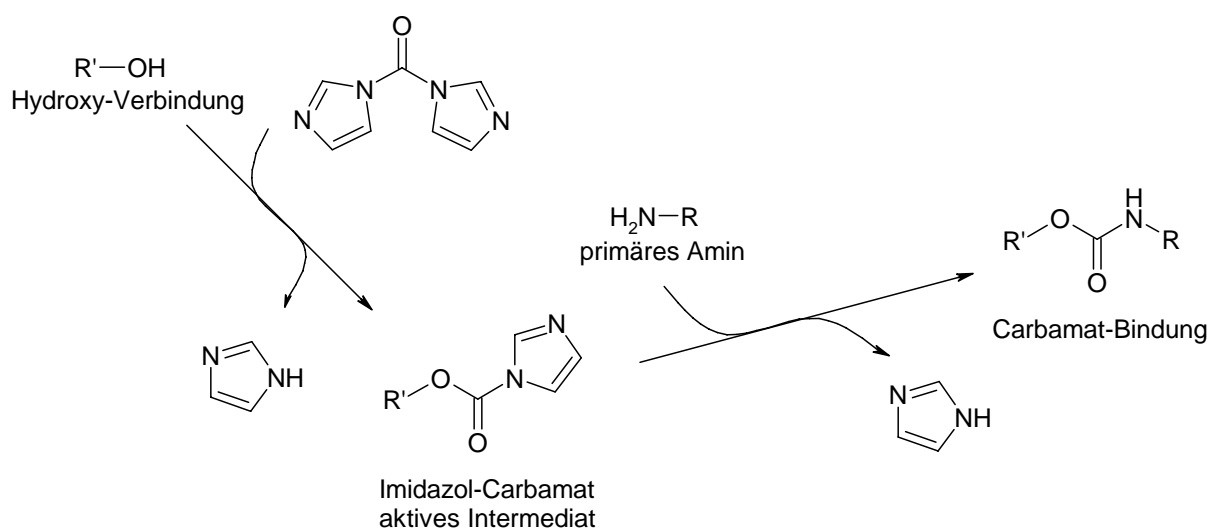


Abbildung 8: Aktivierung eines hydroxyhaltigen Moleküls mit CDI und anschließende Reaktion mit einem Amin [nach ^[164]]

Sowohl mit DSC als auch mit CDI aktivierte Hydroxygruppen reagieren mit Aminen zu einer stabilen Amid- beziehungsweise Carbamat-Bindung. Ein direkter Vergleich der beiden Aktivierungsreagenzien zeigt, dass bei Tetra(Ethylenoxid) terminierten Monoschichten, die mit DSC aktiviert wurden, ein höherer Prozentsatz mit dem Protein reagiert als bei den Monoschichten, die mit CDI aktiviert wurden.^[173] BÖCKING et al. führten dies auf die Hydrolyse des Intermediats zurück,^[173] die jedoch über den pH-Wert gesteuert werden kann. Bei einem Vergleich der Hydrolyseempfindlichkeit des Intermediats kann festgestellt werden, dass NHS-Ester an einer Oberfläche an Luft bereits durch die Umgebungsfeuchtigkeit hydrolysiert^[174, 175] und in einer Lösung bei neutralem pH-Wert innerhalb von Stunden deaktiviert werden.^[164, 175] Mit CDI aktiviertes PEG hingegen ist in trockenem Zustand stabil,^[164] bei pH 6-7 beträgt die Halbwertszeit etwa 70 Stunden^[176] und mit CDI aktiviertes diol-funktionalisiertes Silika-Gel ist mehr als 6 Tage in PBS-Puffer haltbar,^[177] so dass eine Kopplung des Proteins auch in Puffer ermöglicht wird. Im basischen Bereich jedoch wird innerhalb von 24 Stunden eine komplette Hydrolyse erreicht,^[164, 178] die zur Deaktivierung der verbleibenden Intermediate verwendet werden kann. Ausgehend von einer besseren Lagerstabilität der Intermediate wird daher in dieser Arbeit CDI zur Aktivierung verwendet.

Reaktion mit Aldehyden

Aldehydfunktionen sind ebenfalls zur Anbindung von Proteinen über deren Aminogruppen geeignet. Die Aktivierung von Oberflächen, die zumeist aminofunktionalisiert sind, mit Glutaraldehyd ist weit verbreitet und wird zur Immobilisierung der verschiedensten Enzyme und Antikörper eingesetzt.^[179, 180] HONG et al. konnten außerdem zeigen, dass eine Monoschicht aus Undecenaldehyd auf Silizium in der Lage ist, verschiedene Proteine unter Erhaltung ihrer Funktionalität zu binden.^[181] Da bei der Reaktion von Aldehyden mit Aminen zunächst eine Schiff'sche Base als Intermediat entsteht, welche im Gleichgewicht mit den Edukten ist, muss diese zu einer sekundären Amin-Bindung reduziert werden.^[164] Dies erfordert jedoch keinen weiteren Reaktionsschritt, HONG et al. führten die Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid *in situ* durch.^[181] Um eine Aldehydfunktion in ein Copolymer einzubringen, werden zunächst Comonomere verwendet, in denen die Aldehydfunktion in Form eines Acetals^[182] oder Dioxolans^[183] geschützt ist, um unerwünschte Nebenreaktionen und Cyclisierungen zu vermeiden. In einer anschließenden polymeranalogen Reaktion wird die Schutzgruppe entfernt und das Protein kann angebunden werden. Zwar wird durch die Verwendung einer Schutzgruppe ein zusätzlicher Reaktionsschritt benötigt, auf Grund des

erfolgreichen Einsatzes von Aldehyden zur Immobilisierung und der Effizienz sowohl bei niedrigen als auch hohen pH-Werten^[164] wird dies aber nicht als Problem angesehen.

Reaktion mit Epoxiden

Als feste Träger zur Immobilisierung von Proteinen sind Epoxy-Polymere in verschiedenen Formen, zum Beispiel als makroporöse Perlen oder Pulver, erhältlich. Die gute Lagerstabilität und die milden Reaktionsbedingungen, die zur Anbindung der Proteine benötigt werden, sind entscheidende Vorteile für den Einsatz im industriellen Bereich.^[162] Weiterhin reagieren Epoxide mit einer Vielzahl an funktionellen Gruppen, beispielsweise Aminen, Thiolen und Hydroxygruppen unter Ausbildung einer stabilen Bindung.^[160] CULLEN et al. konnten zeigen, dass von einem an einen vernetzten Film aus Poly(GMA-co-2-AOEMA) gebundenem Oligonucleotid nach zweitägigem Waschen mit destilliertem Wasser noch 60 % der ursprünglichen Menge gebunden sind.^[184] Die Reaktivität gegenüber verschiedenen funktionellen Gruppen erlaubt weiterhin eine Aktivierung mit weiteren funktionellen Gruppen.^[185] Für eine spezifische und orientierte Immobilisierung über Thiolgruppen kann die Epoxidfunktion beispielsweise mit Pyridyldisulfid aktiviert werden.^[186] Bei Proteinen, die viele Carboxylgruppen enthalten, wie Invertase, können die Epoxidgruppen mit Hilfe von Hydrazin in Aminogruppen umgewandelt werden.^[187] In vorhergehenden Arbeiten konnte außerdem bereits bestätigt werden, dass sich BMP2 mit Hilfe eines Epoxid-enthaltenden Copolymers auf Titan immobilisieren lässt.^[188] Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist nun die weitergehende Charakterisierung der Copolymerschichten und Verbesserung der Anbindung von BMP2.

3.3.2 Anbindung an die Oberfläche

Um die Copolymere kovalent an die Titanoberfläche zu binden, gibt es verschiedene funktionelle Gruppen. Sowohl Silane als auch Phosphonate sind zur Modifikation von Titan geeignete oberflächenaktive Substanzen. Die möglichen Bindungsstellen der Silane sind jedoch durch die Anzahl der Hydroxygruppen auf der Oberfläche beschränkt^[23] und die Titanoberfläche besteht nur zu 15 % aus Hydroxygruppen.^[189] Daher ist es auch möglich, mit einer Phosphonat-Ankergruppe im Vergleich zu Silanen auf Titan eine größere Menge anzubinden.^[190] Ein weiteres Problem ist die Hydrolyseempfindlichkeit der Si-O-Bindungen. Bereits nach 7 Tagen bei einem physiologischen pH-Wert von 7,5 ist fast die gesamte Menge einer gebundenen fluoreszenz-markierten Aminosäure abgespalten worden, während im Vergleich dazu die über einen Phosphonat-Anker gebundene Aminosäure nahezu in

identischer Menge wie zu Beginn vorliegt.^[190] Somit würde bei einer Implantation bereits nach kurzer Zeit ein Verlust des gebundenen Proteins auftreten und die Wirksamkeit deutlich verringert werden. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von Silanen ist die notwendige Vorbehandlung des Titans mit Hilfe von Plasma oder Wasserstoffperoxid um eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.^[7] Neben der Fähigkeit zur Anbindung an Metalle beziehungsweise deren Oxide besitzen Phosphate, Phosphonate und Phosphonsäuren außerdem noch einen besonderen Einfluss auf die Biokompatibilität. Phosphate sind in der Lage, Calcium-Ionen zu komplexieren und somit die Biomineralisation durch Bildung von Hydroxylapatit zu induzieren.^[191] VIORNERY et al. untersuchten die Proliferation von Osteoblasten auf mit verschiedenen Phosphonsäuren modifiziertem Titan und bestätigten, dass diese im Vergleich zu unbehandeltem Titan nicht beeinflusst wird.^[16] GEMEINHART et al. konnten außerdem zeigen, dass Poly(vinylphosphonsäure) die Adhäsion und Proliferation von Preosteoblasten durch Wechselwirkung mit Serumproteinen fördert.^[192]

Der Vergleich zeigt, dass für den vorliegenden Fall Phosphonate besser geeignet sind als Silane, daher werden für die Anbindung der Polymere an Titan im Rahmen dieser Arbeit Phosphonate verwendet.

3.3.3 Ausgewählte Copolymersysteme

Aus den vorgestellten funktionellen Gruppen ergeben sich somit zwei Klassen von Monomeren, die kombiniert werden können. Das aus Vorarbeiten im Rahmen der Diplomarbeit^[188] bereits bekannte Copolymer (Poly-VBP-co-GMA) beinhaltet die Epoxidfunktion zur Anbindung des BMP2 und als oberflächenaktives Monomer Vinylbenzylphosphonat. Untersuchungen zur Biokompatibilität mit C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen haben gezeigt, dass Poly(vinylbenzylphosphonat) eine hervorragende Biokompatibilität aufweist und daher für die Beschichtung von Implantaten sehr gut geeignet ist.^[193] Vinylbenzylphosphonat wird ebenfalls zur Herstellung eines aldehydtragenden Copolymers (Poly-VBP-co-FMMA) sowie als Comonomer für das mit CDI aktivierbare Hydroxyethylmethacrylat (Poly-VBP-co-HEMA) verwendet, um bei der Bestimmung der angebundenen BMP2-Menge einen Einfluss der oberflächenaktiven Gruppe auszuschließen. HEMA wird dabei als Modellmonomer ausgewählt, da es die kleinste Einheit eines Ethylenglykol-Spacers trägt. Wenn gezeigt werden kann, dass BMP2 über dieses Verfahren immobilisiert werden kann, besteht die Möglichkeit, den Spacer zu verlängern und das BMP2 aus der Beschichtung herausragen zu lassen. Ein Austausch des VBPs gegen Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat bei der Copolymerisation mit HEMA soll schließlich

zeigen, ob die erhöhte Hydrophilie des DMMEPs einen Einfluss auf die Anbindung des Proteins zeigt. Daraus ergeben sich folgende Copolymere, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und eingesetzt werden:

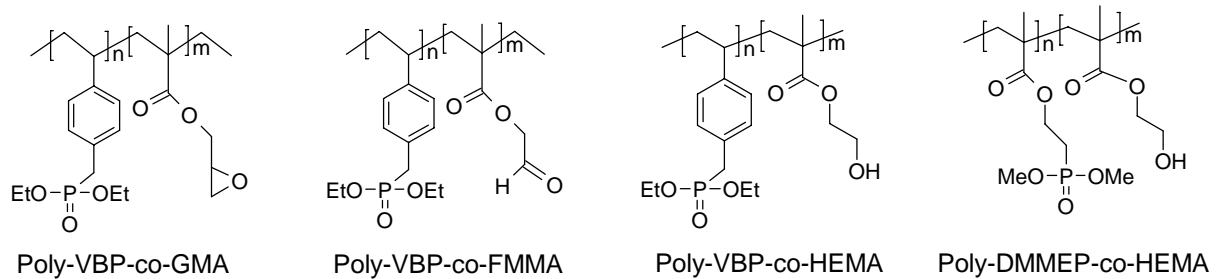


Abbildung 9: Herzustellende Copolymersysteme

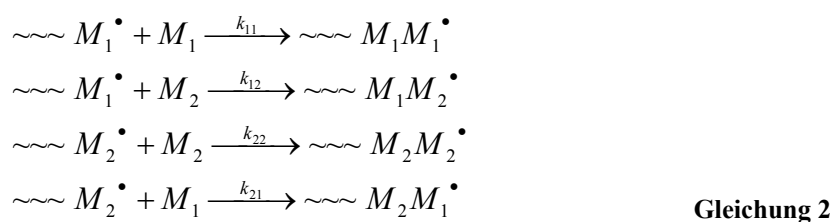
4 Methoden zur Charakterisierung von Polymeren und dünnen Polymerfilmen

4.1 Copolymerisation

Oft erfüllt ein einzelnes Polymer nicht die Anforderungen hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften. In solchen Fällen ist es möglich, verschiedene Monomere zu einem Copolymer zu kombinieren, welches dann die Eigenschaften sowohl des einen als auch des anderen Monomers in sich trägt. Dabei sind dann verschiedene Anordnungen der Monomere im Copolymer denkbar. In einem statistisch aufgebauten Copolymer werden die Monomere A und B zufällig eingebaut, so dass sowohl Verknüpfungen zwischen A und B als auch A und A sowie B und B entstehen können. Alternierende Copolymere hingegen enthalten nur Bindungen zwischen den Monomeren A und B. In Block-Copolymeren ist die Länge des Blocks eines Monomeren einstellbar, im Extremfall besteht nur eine einzige A-B-Verknüpfung bei gleichzeitigem Vorhandensein von sehr langen Blöcken der jeweiligen Monomere. Bei Propfcopolymeren werden an das Polymerrückgrat aus einem Monomer kürzere Ketten des anderen Monomers geknüpft.

Die grundlegenden Prinzipien und Gesetzmäßigkeiten einer Copolymerisation werden im Folgenden auf Basis der gängigen Lehrbücher^[194-196] kurz dargestellt.

Bei der Betrachtung der Kinetik muss berücksichtigt werden, dass durch das Vorhandensein zweier Monomere bei der Polymerisation auch zwei Arten von reaktiven Kettenenden anwesend sind. Diese können dann in vier verschiedenen Wachstumsschritten reagieren:



Mit der Annahme, dass die Reaktivität des Kettenendes von der Art der Endgruppe abhängt und nicht von der Kettenlänge, lässt sich die Geschwindigkeit der Abnahme von Monomer A wie folgt darstellen:

$$-\frac{d[M_1]}{dt} = k_{11}[M_1^\bullet][M_1] + k_{21}[M_1^\bullet][M_2]
 \tag{Gleichung 3}$$

Diese Gleichung kann analog für Monomer B formuliert werden.

Das Verhältnis, in dem die beiden Monomere in das Copolymer eingebaut werden, wird durch die Division der Gleichung 3 für Monomer A und B beschrieben:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{k_{11}[M_1^\bullet][M_1] + k_{21}[M_2^\bullet][M_1]}{k_{12}[M_1^\bullet][M_2] + k_{22}[M_2^\bullet][M_2]} \quad \text{Gleichung 4}$$

Wenn angenommen wird, dass ein stationärer Zustand vorliegt, das heißt genauso viele aktive Kettenenden beendet wie gebildet werden, gilt:

$$k_{21}[M_1][M_2^\bullet] = k_{12}[M_2][M_1^\bullet] \quad \text{Gleichung 5}$$

Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des aktiven Kettenendes mit dem eigenen Monomer zu der Geschwindigkeitskonstante bei der Reaktion mit dem anderen Monomer stellt die sogenannten r-Parameter dar:

$$r_1 = \frac{k_{11}}{k_{12}} \quad \text{und} \quad r_2 = \frac{k_{22}}{k_{21}} \quad \text{Gleichung 6}$$

Werden Gleichung 5 und Gleichung 6 nun in Gleichung 4 eingesetzt, ergibt sich die Copolymerisationsgleichung nach MAYO-LEWIS:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1](r_1[M_1] + [M_2])}{[M_2](r_2[M_2] + [M_1])} \quad \text{Gleichung 7}$$

Diese erlaubt die Berechnung der Anteile der Monomere im Copolymer bei bekannter Zusammensetzung der Monomermischung und r-Parametern.

Zur Bestimmung der r-Parameter wird die Copolymerisation in verschiedenen Verhältnissen bei einem geringen Umsatz durchgeführt, so dass die Konzentrationen möglichst konstant bleiben. Anschließend werden die Zusammensetzungen der Copolymere bestimmt. Die Zusammensetzung der Monomermischung X und die Zusammensetzung der Copolymere Y

$$X = \frac{M_1}{M_2} \quad \text{und} \quad Y = \frac{m_1}{m_2} \quad \text{Gleichung 8}$$

werden für die Bestimmung der Copolymerisationsparameter nach FINEMAN-ROSS nach folgender Geradengleichung aufgetragen:

$$\frac{(Y-1)X}{Y} = r_1 \frac{X^2}{Y} - r_2 \quad \text{Gleichung 9}$$

r_1 wird aus der Steigung und r_2 aus dem Achsenabschnitt bestimmt.

Die Methode nach FINEMAN-ROSS ist jedoch nur für Umsätze bis 5 % gültig, für Copolymerisationen mit Umsätzen bis zu 50 % wird die Methode nach KELEN-TÜDÖS verwendet. Dafür wird noch eine Konstante α eingeführt, die eine gleichmäßige Gewichtung der Werte berücksichtigt. Mit

$$G = \frac{X(Y-1)}{Y} \quad \text{und} \quad F = \frac{X^2}{Y} \quad \text{und} \quad \alpha = \sqrt{F_{\max} \cdot F_{\min}} \quad \text{Gleichung 10}$$

ergibt sich daher

$$\frac{G}{\alpha + F} = \left(r_1 + \frac{r_2}{\alpha} \right) \frac{F}{\alpha + F} - \frac{r_2}{\alpha} \quad \text{Gleichung 11}$$

Bei der Auftragung von $G/\alpha + F$ gegen $F/\alpha + F$ resultiert eine Gerade, bei der r_1 durch Extrapolation von $F/\alpha + F$ gegen 1 bestimmt wird. Für $F/\alpha + F$ gleich 0 folgt $-r_2/\alpha$.

Anhand der r-Parameter können dann auch Rückschlüsse auf die Anordnung der Monomere im Copolymer gezogen werden. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten:

Ist $r_1 = r_2 = 1$, werden beide Monomere an beide Radikalkettenenden mit gleicher Wahrscheinlichkeit addiert. Die Verteilung der Monomere im Copolymer ist daher statistisch. Da keines der Monomere bevorzugt eingebaut wird, entspricht die Zusammensetzung des Copolymers der Zusammensetzung des Monomergemisches. Eine grafische Darstellung dieses Zusammenhangs befindet sich in Kurve I in Abbildung 10. Ein alternierendes Copolymer hingegen entsteht, wenn die r-Parameter um Null liegen. Die Geschwindigkeit für die Reaktion mit dem eigenen Monomer ist dann nahezu Null und es wird jeweils das andere Monomer an das Kettenende addiert. Wenn $r_1 > 1$ und $r_2 < 1$ sind, ist die Reaktivität von Monomer M_1 höher und es wird im Vergleich zu Monomer M_2 bevorzugt an Radikalkettenenden sowohl an das eigene als auch das fremde Monomer addiert. Sind beide r-Parameter größer als 1, läuft die Reaktion des aktiven Kettenendes mit dem eigenen Monomer bevorzugt ab, so dass längere Sequenzen oder Blöcke des jeweiligen Monomers entstehen. Im Extremfall findet gar keine Copolymerisation statt und es werden stattdessen Homopolymere gebildet.

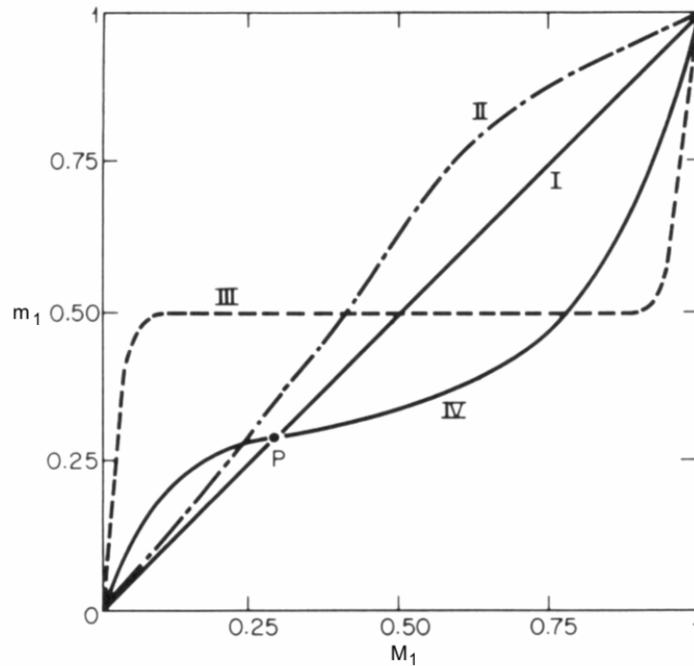


Abbildung 10: Copolymerisationsdiagramm für verschiedene r -Parameter. M_1 Konzentration von M in der Monomerenmischung, m_1 Konzentration von M im Copolymer, P azeotroper Punkt. Die Zusammensetzung des Copolymers ist I statistisch, II annähernd ideal, III alternierend, IV zwischen alternierend und statistisch.^[194]

Die Wahrscheinlichkeit, mit der die Verknüpfung eines Monomers an ein bestimmtes Kettenende erfolgt, ist gegeben durch den Quotienten aus der Reaktionsgeschwindigkeit für den jeweiligen Schritt und der Summe der Geschwindigkeiten aller möglichen Reaktionsgeschwindigkeiten:

$$P(M_2/M_1) = \frac{v_{12}}{v_{11} + v_{12}} \quad \text{Gleichung 12}$$

Nach Ersetzen der Reaktionsgeschwindigkeiten durch die r -Parameter und Monomerkonzentrationen als bekannten Größen gilt:

$$P(M_2/M_1) = \frac{1}{1 + r_1 \frac{[M_1]}{[M_2]}} \quad \text{und} \quad P(M_1/M_2) = \frac{1}{1 + r_2 \frac{[M_2]}{[M_1]}} \quad \text{Gleichung 13}$$

Mit Hilfe der Wahrscheinlichkeiten kann nun die mittlere Länge nM einer Sequenz aus M_1 beziehungsweise M_2 berechnet werden. Dabei gilt

$$nM_1 = \frac{P(M_1)}{P(M_1M_2)} \quad \text{Gleichung 14}$$

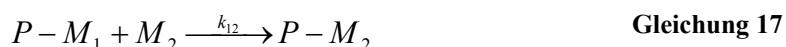
Mit

$$P(M_1M_2) = P(M_1) \cdot P(M_2/M_1) \quad \text{Gleichung 15}$$

ergeben sich daraus für die Blocklängen nM_1 und nM_2

$$nM_1 = \frac{1}{P(M_2/M_1)} \quad \text{und} \quad nM_2 = \frac{1}{P(M_1/M_2)} \quad \text{Gleichung 16}$$

Die Reaktivität der Monomere ist abhängig von der Resonanzstabilisierung, der Polarisation und sterischen Effekten. Die Resonanzstabilisierung bezieht sich dabei hauptsächlich auf das aktive Kettenende: Kann das Radikal durch die Substituenten stabilisiert werden, wird die Geschwindigkeit der Reaktion mit einem Monomer geringer. Die Polarisation der Monomere wird ebenfalls durch die Seitengruppen bestimmt, die entweder die Elektronendichte der Doppelbindung erhöhen oder herabsenken können. Je unterschiedlicher dabei die Polarisation der Monomere ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines alternierenden Einbaus der Monomere. Um den Einfluss dieser Effekte zu quantifizieren, haben ALFREY und PRICE das Q,e-Schema entwickelt. Für die Reaktion



gilt

$$k_{12} = P_1 \cdot Q_2 \cdot \exp(-e_1 \cdot e_2) \quad \text{Gleichung 18}$$

Dabei ist P proportional der Reaktivität des Radikals und Q proportional zu der Reaktivität des Monomers. Die Polaritäten des Kettenradikals beziehungsweise des Monomers werden durch e_1 beziehungsweise e_2 ausgedrückt. Durch Umformungen werden folgende Gleichungen für r_1 und r_2 erhalten

$$r_1 = \frac{Q_1}{Q_2} \exp(-e_1(e_1 - e_2)) \quad \text{und} \quad r_2 = \frac{Q_2}{Q_1} \exp(-e_2(e_2 - e_1)) \quad \text{Gleichung 19}$$

Mit Hilfe der willkürlichen Annahme von $Q = 1$ und $e = -0,8$ für Styrol konnten die Q- und e-Werte für weitere Monomere bestimmt werden, die in der entsprechenden Literatur tabelliert sind. Auf diese Weise ist es möglich, bei bekannten Q,e-Werten eine Aussage darüber zu treffen, ob die beiden Monomere miteinander copolymerisiert werden können. Ähnliche Polaritäten der Monomere, die sich in Vorzeichen und Größe des e-Wertes widerspiegeln, erzeugen beispielsweise eine starke Abstoßung, so dass keine Copolymerisation möglich ist. Des Weiteren können aus den Q,e-Werten theoretische Copolymerisationsparameter

berechnet und damit ein Hinweis auf die Zusammensetzung des Copolymers erhalten werden. Bei der Verwendung des Q,e-Schemas ist es jedoch wichtig zu berücksichtigen, dass es sich dabei nur um eine semi-empirische Annäherung handelt, die die sterischen Effekte außer Acht lässt.

4.2 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die optische Emissionsspektrometrie (OES) ist eine spektroskopische Methode, die auf der Emission von spezifischer Strahlung beruht und zur qualitativen und quantitativen Analytik verwendet wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die OES zur Analytik der Copolymere, das heißt zur Bestimmung des Phosphor-Anteils in den Copolymeren genutzt, da eine Überlagerung der Signale eine Berechnung basierend auf den ^1H -NMR-Spektren nicht ermöglichte. Das Prinzip dieser Methode wird daher im Folgenden nur kurz erläutert, für weiterführende Informationen sei auf die Literatur^[197-199] verwiesen.

Atomare Spektren entstehen durch die mit Strahlung verbundenen Übergänge zwischen dem Grundzustand und angeregten Zuständen des Atoms. Dabei gibt es drei verschiedene Möglichkeiten, die in Abbildung 11 dargestellt sind. A) Bei der Absorption von Strahlung wird ein Elektron aus dem Grundzustand in ein höher liegendes Niveau angeregt. B) Bei der induzierten Emission wird dieser Prozess wieder rückgängig gemacht und das Elektron kehrt unter Emission von Strahlung in seinen Grundzustand zurück. C) Kehrt das Elektron aus einem höheren Niveau wieder in seinen Grundzustand, in den es durch kinetische oder elektrische Energie gelangt ist, zurück, handelt es sich um eine spontane Emission.

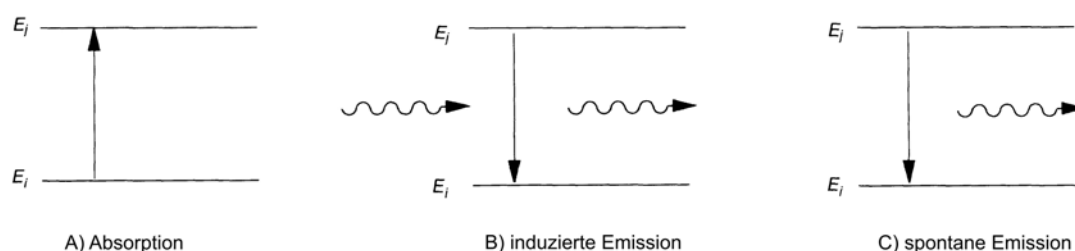


Abbildung 11: Schematische Darstellung der atomaren Übergänge zwischen den Energieniveaus^[198]

Auf Grund der Anordnung und Belegung der Orbitale kann ein Atom nur Energie mit genau definierten Wellenlängen absorbieren oder emittieren, so dass es sich um eine elementspezifische Methode handelt. Die Wellenlängen der emittierten Strahlung können für

eine quantitative Analyse verwendet werden und die Intensität der jeweiligen Wellenlänge erlaubt eine quantitative Bestimmung.

Zur Anregung der Elektronen können verschiedene Quellen genutzt werden, jedoch bietet Plasma den Vorteil einer sehr hohen Temperatur, so dass im Vergleich zu einer Flamme ein deutlich größerer Anteil von Elektronen angeregt werden kann und die Intensität der Emission deutlich verbessert ist. Der Aufbau eines ICP-OES-Instruments (*Inductive Coupled Plasma*) ist in Abbildung 12 dargestellt.

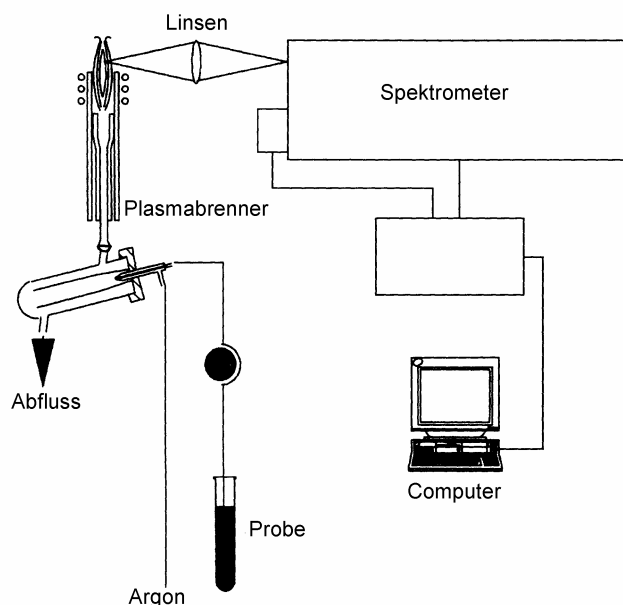


Abbildung 12: Aufbau eines ICP-OES Instruments^[198]

Die flüssige Probe wird zunächst durch einen Vernebler in feine Tröpfchen zerstäubt, welche mit dem Trägergas in die angeschlossene Sprühkammer gelangen, die verhindert, dass zu große Tropfen in das Plasma gelangen. Im Plasma wird die Probe verdampft und dissoziiert in freie Atome und Ionen. Durch eine weitere Aufnahme von Energie werden die Elektronen in höhere Zustände angeregt. Der angeregte Zustand ist jedoch instabil und besitzt nur eine Lebensdauer von etwa 10^{-9} s, daher kehrt das Elektron durch eine spontane Strahlungsemission in den Grundzustand zurück. Über einen Monochromator gelangt die Strahlung schließlich zum Detektor.

4.3 Ellipsometrie

Ellipsometrie beruht auf der Messung der Änderung des Polarisationszustandes des Lichtes nach der Reflektion an einer Oberfläche und dient neben der Bestimmung der optischen Eigenschaften wie dem Brechungsindex im Wesentlichen zur Bestimmung der Schichtdicke

von Mono- oder Multischichten. Schichtdicken zwischen 0,1 nm und 100 μm lassen sich je nach eingesetzter Strahlungsquelle mit einer Genauigkeit von 0,1 nm bei sehr dünnen Schichten und etwa 1 nm bei Schichten im Mikrometerbereich bestimmen. Um eine Einordnung der Ergebnisse zu ermöglichen, werden im Folgenden die zu Grunde liegenden Prinzipien auf Basis einiger Übersichten in der Literatur^[200-202] erläutert.

Licht als elektromagnetische Welle besteht aus einem elektrischen und einem magnetischen Feldvektor, die senkrecht zueinander und zur Ausbreitungsrichtung sind. Zur Beschreibung wird üblicherweise der elektrische Feldvektor herangezogen:

$$A = A_0 \sin\left(-\frac{2\pi}{\lambda}(x - vt) + \zeta\right) \quad \text{Gleichung 20}$$

Dabei ist A die elektrische Feldstärke der Welle, A_0 die Amplitude, x die Distanz, t die Zeit, v die Geschwindigkeit, λ die Wellenlänge und ξ der Phasenwinkel. Die schematische Darstellung einer elektromagnetischen Welle ist in Abbildung 13 dargestellt.

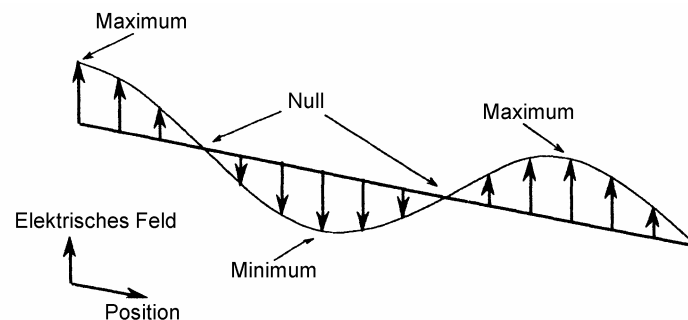


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer elektromagnetischen Welle^[200]

Trifft Licht auf eine Oberfläche, wird es in einen reflektierten und einen transmittierten Teil aufgeteilt. Dies ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

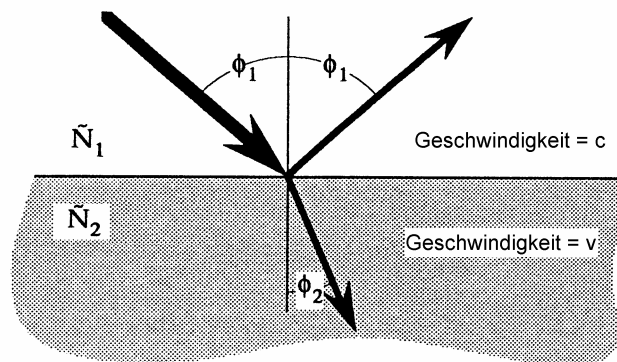


Abbildung 14: Reflexion und Brechung des Lichts an der Grenzfläche zwischen Luft und einem Material mit dem komplexen Brechungsindex \tilde{N}_2 ^[200]

Für die Reflektion gilt, dass der Einfallswinkel dem Reflektionswinkel entspricht:

$$\Phi_i = \Phi_r \quad \text{Gleichung 21}$$

Für den transmittierten Teil gilt:

$$\frac{\sin \Phi_1}{v_1} = \frac{\sin \Phi_2}{v_2} \quad \text{Gleichung 22}$$

Dabei sind v_1 und v_2 die Geschwindigkeiten des Lichts im jeweiligen Medium.

Zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Licht und Material wird der komplexe Brechungsindex verwendet:

$$\tilde{N} = n - ik \quad \text{Gleichung 23}$$

Der reale Teil n wird als Brechungsindex bezeichnet und der imaginäre Teil k als Extinktionskoeffizient. Bei dielektrischen Materialien ist $k=0$ und es gilt

$$n = \frac{c}{v} \quad \text{Gleichung 24}$$

Daraus folgt das Snellsche Gesetz für den gebrochenen Lichtstrahl:

$$n_1 \sin \Phi_1 = n_2 \sin \Phi_2 \quad \text{Gleichung 25}$$

Zur Beschreibung der Amplituden wird die einfallende Welle in ihre zur Einfallsebene senkrechten und parallelen Komponenten zerlegt. Der Fresnel-Reflektionskoeffizient ist dann das Verhältnis aus der Amplitude der reflektierten Welle zu der Amplitude der einfallenden Welle und wird jeweils für die Wellen senkrecht und parallel zur Einfallsebene definiert:

$$r_{12}^P = \frac{\tilde{N}_2 \cos \Phi_1 - \tilde{N}_1 \cos \Phi_2}{\tilde{N}_2 \cos \Phi_1 + \tilde{N}_1 \cos \Phi_2} \quad r_{12}^S = \frac{\tilde{N}_1 \cos \Phi_1 - \tilde{N}_2 \cos \Phi_2}{\tilde{N}_1 \cos \Phi_1 + \tilde{N}_2 \cos \Phi_2} \quad \text{Gleichung 26}$$

Für eine allgemeine Formulierung wurde hier wieder der komplexe Brechungsindex N verwendet.

Der Reflektionsgrad wird als das Verhältnis der Intensität der reflektierten Welle I_r durch die Intensität der einfallenden Welle I_i definiert. Die Intensität ist abhängig vom Quadrat der Energie der jeweiligen Welle. Es gilt daher für eine einzelne Grenzfläche:

$$R = \frac{I_r}{I_i} = |r|^2 \quad \text{mit} \quad r = \frac{E_r}{E_i} \quad \text{Gleichung 27}$$

Bei den tatsächlich untersuchten multiplen Grenzflächen wie in Abbildung 15 ist zu berücksichtigen, dass das reflektierte Licht eine Überlagerung der Wellen aus multiplen

Reflektionen ist. Die resultierende reflektierte Welle, die zu Medium 1 zurückkehrt, besteht somit aus dem Licht, das direkt an der ersten Grenzfläche reflektiert wird, sowie aus den Transmissionen, die aus Medium 2 zur ersten Grenzfläche zurückkehren. Das Verhältnis der Amplituden aus reflektierter und einfallender Welle wird für diesen Fall als totaler Reflektionskoeffizient definiert:

$$R^P = \frac{r_{12}^P + r_{23}^P \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^P r_{23}^P \exp(-i2\beta)} \quad R^S = \frac{r_{12}^S + r_{23}^S \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^S r_{23}^S \exp(-i2\beta)} \quad \text{Gleichung 28}$$

Der Index 23 demonstriert, dass es sich dabei um die Grenzfläche zwischen Medium 2 und 3 handelt. Außerdem wird die Filmphasendicke β eingeführt

$$\beta = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) \tilde{N}_2 \cos \Phi_2 \quad \text{Gleichung 29}$$

die d für die Schichtdicke von Medium 2 enthält.

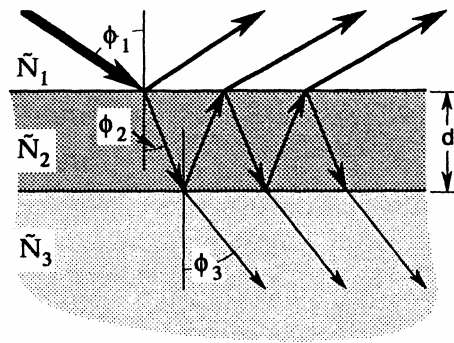


Abbildung 15: Reflexion und Transmission an multiplen Grenzflächen^[200]

Durch die Reflexion von linear polarisiertem Licht auf einer Oberfläche entsteht elliptisch polarisiertes Licht, da eine für beide Komponenten unterschiedliche Phasenverschiebung eintritt, die von den optischen Eigenschaften der Probe und des Films abhängt. Der Unterschied zwischen linear und elliptisch polarisiertem Licht wird in Abbildung 16 deutlich.

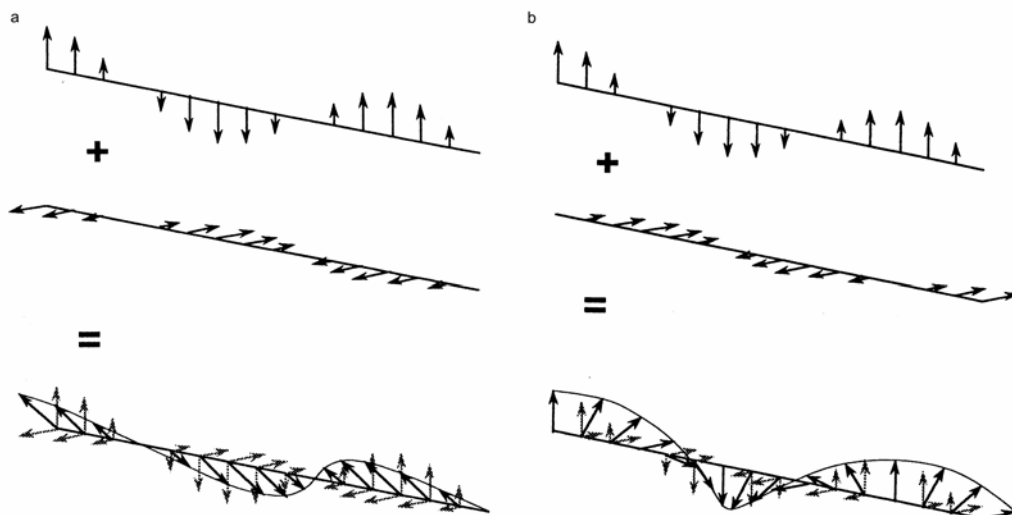


Abbildung 16: Kombination zweier linear polarisierter Wellen a) in Phase zu einer linear polarisierten Welle und b) mit unterschiedlicher Phase zu einer elliptisch polarisierten Welle ^[200]

Handelsübliche Lichtquellen geben Licht ab, dessen elektrische Felder in verschiedene Richtungen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung liegen, das Licht ist daher unpolarisiert. Befinden sich jedoch die Felder aller Photonen in einer Ebene, handelt es sich um linear polarisiertes Licht. Werden zwei linear polarisierte Wellen mit gleicher Frequenz in Phase kombiniert, ist die resultierende Welle ebenfalls linear polarisiert. Besteht jedoch eine Phasendifferenz, entsteht elliptisch polarisiertes Licht und im Spezialfall bei einer Phasendifferenz von 90° zirkular polarisiertes Licht.

Die Phasendifferenz zwischen der parallelen und senkrechten Komponente einer Welle wird als δ bezeichnet, der Index 1 bezieht sich dabei auf die einfallende Welle, 2 auf die reflektierte Welle. Davon ausgehend wird der Parameter Δ definiert als

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2 \quad \text{Gleichung 30}$$

Bei der Reflexion ändert sich außerdem die Amplitude der senkrechten und parallelen Komponenten. Mit $|R^p|$ und $|R^s|$ als Verhältnis der Amplituden der einfallenden und reflektierten Welle wird der Winkel Ψ definiert als

$$\tan \Psi = \frac{|R^p|}{|R^s|} \quad \text{Gleichung 31}$$

Die fundamentale Gleichung der Ellipsometrie ist gegeben durch

$$\tan \Psi e^{i\Delta} = \frac{R^p}{R^s} \quad \text{Gleichung 32}$$

Diese beschreibt die Relation zwischen den messbaren Größen Ψ und Δ und den Probeneigenschaften, die durch R^p und R^s gegeben sind. Für reine Substrate ist die Gleichung lösbar, für komplexe Systeme bedarf es eines Modells, bei dem R^p und R^s den gemessenen Werten entsprechend gefittet werden. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, dass nur die Werte für Ψ und Δ stets korrekt sind, Größen wie Schichtdicke, Refraktionsindex und Extinktionskoeffizient basieren nur auf dem Modell, welches entsprechend zu wählen ist.

Um die Eigenschaften eines Films zu bestimmen, müssen zunächst die Eigenschaften des darunter liegenden Substrats bekannt sein. Mit Hilfe des Ellipsometers werden Ψ und Δ bestimmt, der komplexe Brechungsindex für das Substrat ist dann gegeben durch:

$$\tilde{N}_3 = \tilde{N}_1 \tan \Phi_1 \sqrt{1 - \frac{4\rho \sin^2 \Phi_1}{(\rho + 1)^2}} \quad \text{Gleichung 33}$$

Dies kann aufgeteilt werden in

$$n_3^2 - k_3^2 = n_1^2 \sin^2 \Phi_1 \left[1 + \frac{\tan^2 \Phi_1 (\cos^2 2\Psi - \sin^2 \Delta \sin^2 2\Psi)}{(1 + \sin 2\Psi \cos \Delta)^2} \right] \quad \text{Gleichung 34}$$

$$\text{und } 2n_3 k_3 = \frac{n_1^2 \sin^2 \Phi_1 \tan^2 \Phi_1 \sin 4\Psi \sin \Delta}{(1 + \sin 2\Psi \cos \Delta)^2}$$

Bei bekannten Werten für den Brechungsindex und den Extinktionskoeffizienten von Substrat und Film können für verschiedene Schichtdicken die Erwartungswerte von Δ und Ψ berechnet werden. Eine derartige Auftragung wird als Δ/Ψ -Trajektorie bezeichnet, ein Beispiel befindet sich in Abbildung 17 links. Die Schichtdicke kann an der Trajektorie abgelesen werden, wenn die gemessenen Daten mit dieser Kurve verglichen werden. Ist der Brechungsindex des Substrates unbekannt, können die Trajektorien auch für Schichtdicken in Abhängigkeit von verschiedenen Brechungsindices berechnet und dargestellt werden. Eine derartige Auftragung befindet sich in Abbildung 17 rechts.

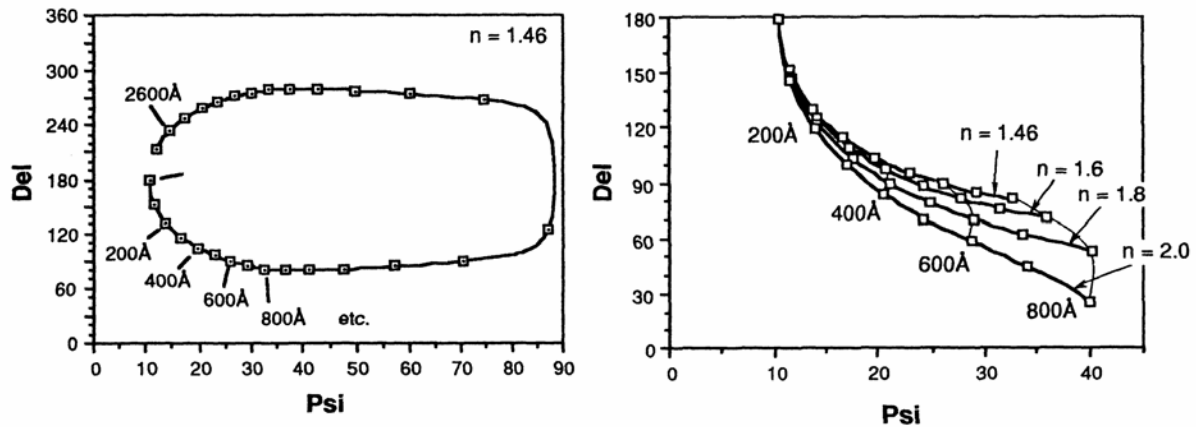


Abbildung 17: links: Δ/Ψ -Trajektorie für Siliziumdioxid auf Silizium mit einem Einfallswinkel von 70° , rechts: Δ/Ψ -Trajektorien für verschiedene Brechungsindizes auf kristallinen Siliziumsubstraten^[200]

Ein Ellipsometer besteht aus einer monochromatischen Lichtquelle, einem Polarisator, der Probe, einem $\lambda/4$ -Plättchen, einem Analysator und einem Detektor. Als Lichtquelle wird im Normalfall ein Laser eingesetzt, dessen unpolarisiertes Licht durch den Polarisator in linear polarisiertes Licht transformiert wird. Durch die Reflektion auf der Probe entsteht dann elliptisch polarisiertes Licht. Da linear polarisiertes Licht jedoch einfacher zu analysieren ist, wird ein weiteres optisches Element, das $\lambda/4$ -Plättchen, dazwischen geschaltet. Dieses erzeugt eine Phasenverschiebung, so dass aus dem elliptisch polarisierten Licht wieder linear polarisiertes Licht erhalten wird. Für den tatsächlichen Gebrauch wird jedoch das $\lambda/4$ -Plättchen vor der Probe auf einen Winkel von 45° eingestellt und Polarisator und Analysator so eingestellt, dass die Elliptizität durch die Reflektion ausgelöscht wird und der Detektor eine Intensität von Null messen kann (vgl. Abbildung 18). Daher wird diese Methode auch als Null-Ellipsometrie bezeichnet. Dieses Verfahren wird genutzt, da die Relation zwischen der Position des Polarisators und Analysators und den Werten von Δ und Ψ für diese Anordnung einfacher ist.

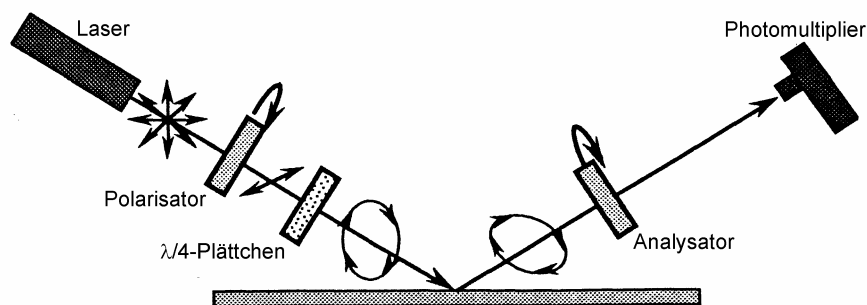


Abbildung 18: Aufbau eines Null-Ellipsometers mit rotierendem Polarisator und Analysator^[200]

4.4 Kontaktwinkel

Die Benetzbarkeit von Oberflächen ist ein anschaulicher Prozess, der auch im Alltag eine wichtige Rolle spielt. Beim Färben von Papier oder Stoffen ist eine sehr gute Benetzbarkeit erforderlich, der sogenannte Lotus-Effekt hingegen beschreibt die sehr geringe Benetzbarkeit, die als Selbstreinigungseffekt industrielle Anwendung gefunden hat. Diese Phänomene sind die makroskopisch beobachtbare Konsequenz von Wechselwirkungen auf der molekularen Ebene, die ausführlich in der entsprechenden Literatur^[67, 203, 204] beschrieben sind. Der Winkel eines Tropfens auf einer Oberfläche resultiert aus dem Gleichgewicht zwischen den Kohäsionskräften in der Flüssigkeit und den Adhäsionskräften zwischen Oberfläche und Flüssigkeit. Findet keine Wechselwirkung statt, nimmt der Tropfen eine minimale Fläche ein, der Kontaktwinkel beträgt dann 180°. Steigt die Wechselwirkung, das heißt die Flüssigkeitsmoleküle bevorzugen den Kontakt mit der Oberfläche gegenüber dem Kontakt mit ihresgleichen, breitet sich die Flüssigkeit aus und der Kontaktwinkel sinkt. Im Extremfall eines Kontaktwinkels von 0° handelt es sich um eine vollständige Benetzung.

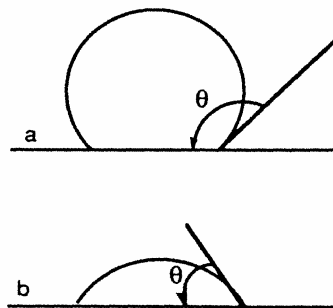


Abbildung 19: a) Kontaktwinkel auf einer hydrophoben Oberfläche mit $\theta = 115^\circ$ und b) auf einer hydrophilen Oberfläche mit $\theta = 45^\circ$ ^[67]

Die Form des Tropfens wird durch die freie Energie der Oberfläche bestimmt. An den Grenzflächen zwischen den drei Phasen gilt ein Gleichgewicht, das durch die YOUNG-Gleichung beschrieben wird:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad \text{Gleichung 35}$$

Dabei ist γ jeweils die freie Energie der flüssig-gasförmig (LV), fest-gasförmig (SV) und fest-flüssig (SL) Grenzfläche und θ der Winkel zwischen der festen und flüssigen Phase (vgl. Abbildung 20)

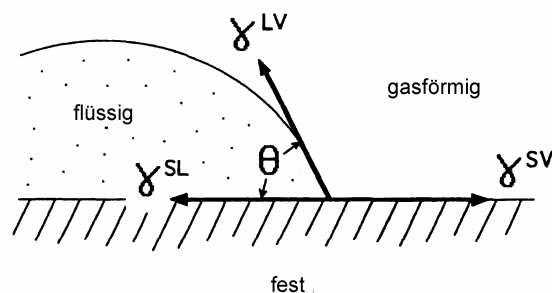


Abbildung 20: Freie Energien an den Phasengrenzflächen^[204]

Die YOUNG-Gleichung beschreibt ideale Bedingungen, unter denen ein statischer Kontaktwinkel gemessen wird. Tatsächlich werden jedoch raue oder chemisch heterogene Oberflächen untersucht, bei denen der Kontaktwinkel nicht einheitlich ist, sondern zwischen einem maximalen Winkel θ_{adv} (*advancing*) und einem minimalen Winkel θ_{rec} (*receding*) liegt. Der Tropfen trifft dabei auf ein lokales Energieminimum auf der Oberfläche, so dass je nach Position verschiedene Kontaktwinkel gemessen werden. Die Differenz zwischen θ_a und θ_r wird als Hysterese bezeichnet und ist ein Maß für die Inhomogenität der Oberfläche.

Zur Bestimmung des Kontaktwinkels gibt es verschiedene Methoden, die schematisch in Abbildung 21 dargestellt sind. Bei der *captive drop*-Methode wird zunächst an der Spitze der Nadel ein Tropfen eines festen Volumens ausgebildet und dieser dann langsam auf eine horizontale Oberfläche abgesenkt. Die Nadel verbleibt im Tropfen, durch Zugabe oder Entnahme eines definierten Flüssigkeitsvolumens kann dann der fortschreitende und rückschreitende Kontaktwinkel gemessen werden. Bei der *tilted plate*-Methode wird die zu untersuchende Probe um einen definierten Winkel gekippt und der am unteren Ende gemessene Winkel ist der fortschreitende (θ_{adv}), der am oberen Ende der rückschreitende (θ_{rec}) Kontaktwinkel.

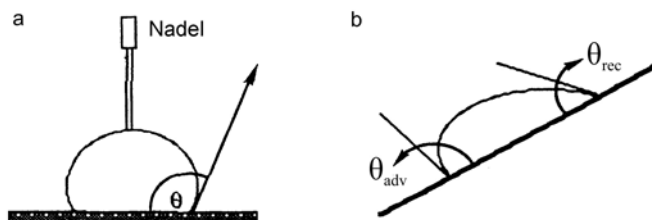


Abbildung 21: Messung des Kontaktwinkels a) als *captive drop* und b) mit der *tilted plate*-Methode^[67]

Auf diese Weise werden in einem einfachen Verfahren sowohl der fortschreitende als auch der rückschreitende Kontaktwinkel erhalten, so dass die *tilted plate*-Methode mit einem Neigungswinkel von 45° auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

4.5 Photoelektronenspektroskopie (XPS)

Die ersten Experimente zum photoelektrischen Effekt wurden bereits in den Anfängen des 20. Jahrhunderts durchgeführt, die Entwicklung zu einer sensitiven Methode der Oberflächenanalytik begann jedoch erst durch SIEGBAHN und seine Mitarbeiter in den 50er Jahren. Die Möglichkeit, detaillierte Informationen über die chemische Zusammensetzung und die Bindungsverhältnisse zu erhalten, macht die Photoelektronenspektroskopie zu einer der am weitesten verbreiteten Analytikmethoden in Bereichen wie zum Beispiel Oberflächenbehandlung, Korrosion, Katalyse, Elektronik usw. Die folgende kurze Einführung soll die Interpretation der Ergebnisse erleichtern, für eine ausführliche Darstellung sei jedoch auf die Literatur^[205-209] verwiesen.

EINSTEIN erklärte den von HERTZ und HALLWACHS beobachteten photoelektrischen Effekt, bei dem durch elektromagnetische Strahlung Elektronen aus einer Metalloberfläche herausgelöst werden, damit, dass Licht aus Photonen mit der Energie $h\nu$ besteht, dabei ist h die Planck-Konstante und ν die Frequenz des Lichtes. Trifft ein solches Photon auf eine Oberfläche, ist es in der Lage, ein Elektron unter Leistung der Austrittsarbeit Φ aus dem Valenzband herauszuschlagen. Die Energie des Elektrons wird beschrieben durch

$$E_{kin} = h\nu - \Phi \quad \text{Gleichung 36}$$

wenn sich das Elektron im höchsten besetzten Niveau mit der Fermi-Energie E_{Fermi} befunden hat. Dies gelingt bei Strahlung mit niedriger Energie von maximal 50 eV, beispielsweise UV-Strahlung. Wird hochenergetische Strahlung, beispielsweise Röntgenstrahlung mit Energien über 1000 eV eingesetzt, so besitzen die Photonen ausreichend Energie, um auch Elektronen, die zunächst noch die Bindungsenergie E_B aufbringen müssen, aus dem Kern herauszuschlagen (vgl. Abbildung 22).

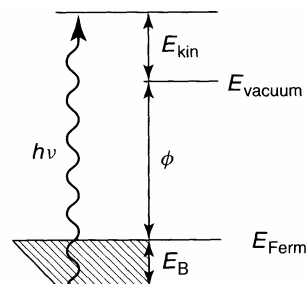


Abbildung 22: Energiediagramm für die Photoemission^[206]

Das Elektron besitzt dann die kinetische Energie

$$E_{kin} = h\nu - E_B - \Phi$$

Gleichung 37

Die Energien sind charakteristisch für jedes Element, so dass eine Bestimmung der einzelnen Elemente ermöglicht wird. Da die Bindungsenergie außerdem durch die chemische Umgebung bestimmt wird, wird die Methode auch als *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis* (ESCA) bezeichnet. Der schematische Aufbau eines Photoelektronenspektrometers ist in Abbildung 23 dargestellt. Um die Elektronen aus der Oberfläche herauszulösen, werden Photonen mit einer Energie, die größer ist als die Bindungsenergie der Photoelektronen benötigt. Durch einen Beschuss mit hochenergetischen Elektronen wird dazu K_α -Strahlung erzeugt, deren Energie bei den üblicherweise verwendeten Targets bei Al 1486,6 eV und bei Magnesium 1253,6 eV beträgt. Da die Linienbreite der Mg K_α -Strahlung geringer ist als die der Al K_α -Strahlung, kann damit eine höhere Auflösung erzeugt werden. Um neben der K_α -Linie entstehende Satelliten und den Hintergrund zu entfernen, kann ein kristalliner Monochromator eingesetzt werden, so dass die Auflösung zusätzlich verbessert wird.

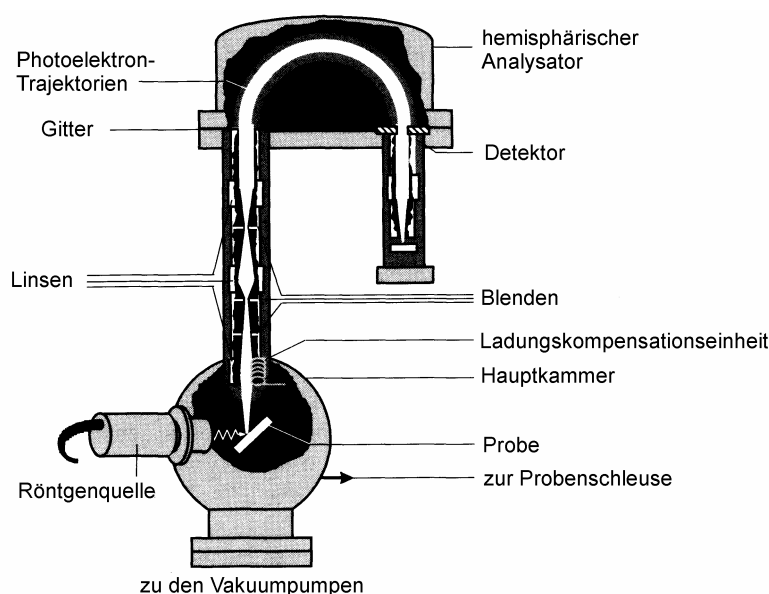


Abbildung 23: Typischer Aufbau eines Photoelektronenspektrometers ^[205]

Da es sich bei der Photoelektronenspektroskopie um eine sehr sensitive Methode handelt, deren Eindringtiefe nur ein paar atomare Lagen beträgt, ist es leicht ersichtlich, dass Kontaminationen der Oberfläche während der Messung vermieden werden müssen. Dazu wird ein Vakuum von mindestens 10^{-8} Pa angelegt, welches außerdem die Wechselwirkungen zwischen den Photoelektronen und den umgebenden Gasmolekülen verhindert, die zu einem Verlust der kinetischen Energie führen.

Ein wichtiger Bestandteil zur Bestimmung der kinetischen Energie ist der konzentrische hemisphärische Analysator, der in Abbildung 24 dargestellt ist. Er besteht aus zwei

Hemisphären mit den Radien R_1 und R_2 , die konzentrisch positioniert sind und an die die Spannungen V_1 und V_2 angelegt sind. Durch das Potential werden die Elektronen auf eine Kreisbahn abgelenkt und auf den Austrittsspalt fokussiert, dies gelingt aber nur, wenn sie die richtige Energie, die sogenannte Pass-Energie besitzen. Dazu wird vor den Analysator ein Linsensystem oder Gitter geschaltet, welches die Elektronen auf die Pass-Energie verlangsamt. Für die Auflösung des Analysators gilt:

$$\frac{\Delta E}{E_0} = 0,63 \frac{w}{R_0} \quad \text{Gleichung 38}$$

mit ΔE der Breite bei halber Höhe eines Peaks als Maß für die Auflösung, der Pass-Energie E_0 , w der Breite des Ein- beziehungsweise Austrittsspalts und R_0 dem Radius der idealen Bahn zwischen den Hemisphären.

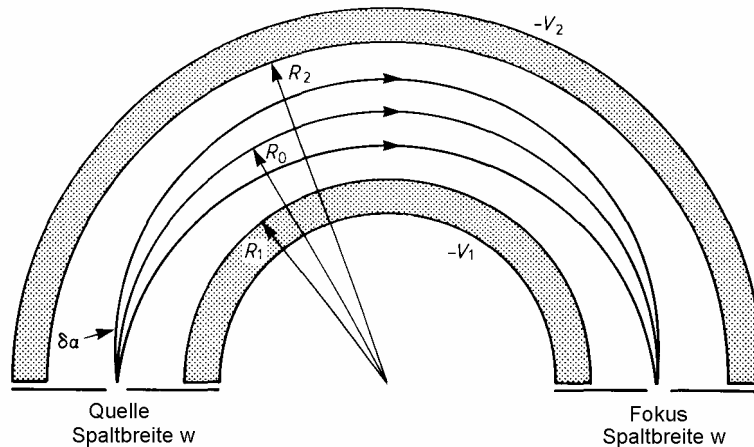


Abbildung 24: Schematischer Querschnitt eines konzentrischen hemisphärischen Analysators^[209]

Abbildung 25 zeigt ein Übersichtsspektrum von Poly(3-Hydroxybutyrat) auf einem Silizium-Wafer. Entsprechend der Beschichtung sind dort zunächst die Elementpeaks von Sauerstoff und Kohlenstoff zu sehen, außerdem verschiedene Silizium-Peaks des Substrats.

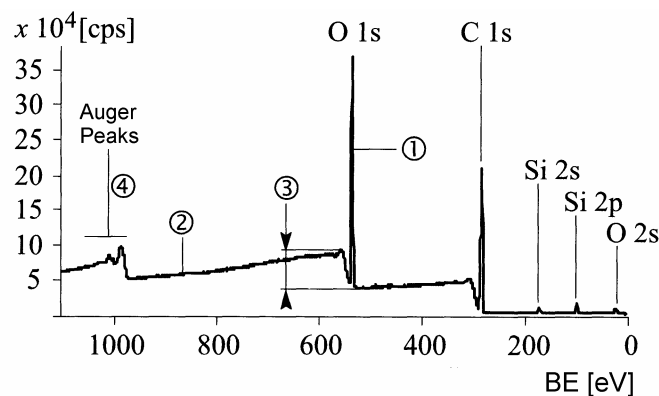


Abbildung 25: Übersichtsspektrum von Poly(3-Hydroxybutyrat)^[205]

Die Bezeichnung der Peaks basiert auf dem Orbital, aus dem das Elektron herausgeschlagen wurde. Die Hauptquantenzahl $n=1,2,3,\dots$ beschreibt das Orbital, zusätzlich werden die Buchstaben s, p, d, f für den Bahndrehimpuls l hinzugefügt. Als Index wird die Spin-Bahn-Kopplung j angegeben, die sich aus dem Bahndrehimpuls und dem Spin s zusammensetzt:

$$j = l + s$$

Gleichung 39

Neben den Photoelektronen gibt es auch inelastisch gestreute Elektronen, die einen Teil ihrer Energie bei der Wechselwirkung mit anderen Elektronen verloren haben. Diese bilden den Hintergrund und nach jedem Elementpeak entsteht eine Stufe in der Zählrate durch die inelastische Streuung der Elektronen des jeweiligen Elements.

Weitere Peaks, die in ihrer Form breiter sind und meistens als Multiplett auftreten, entstehen durch die Auger-Elektronen. Wenn ein Elektron ein inneres Orbital verlassen hat, kann ein Elektron aus einem höheren Orbital dorthin relaxieren. Die dabei freigesetzte Energie kann ein weiteres Elektron herauslösen, das sogenannte Auger-Elektron. Die Entstehung eines Auger-Elektrons ist graphisch in Abbildung 26 dargestellt.

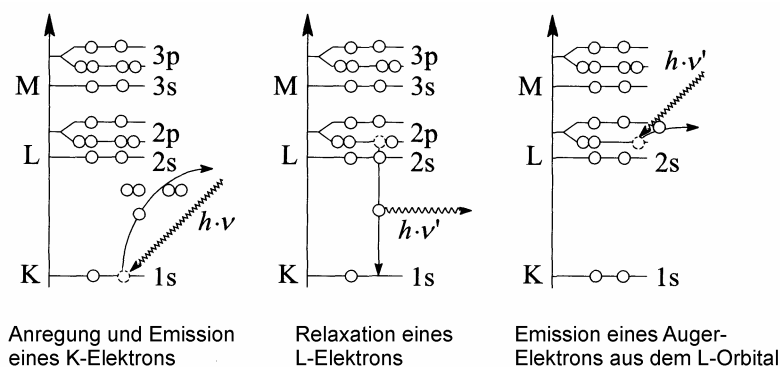


Abbildung 26: Prozess der Entstehung von Auger-Elektronen^[205]

Der Detektor kann nicht zwischen den Photoelektronen und Auger-Elektronen unterscheiden, daher sind beide im XPS-Spektrum sichtbar. Wenn jedoch eine andere Strahlenquelle verwendet und die Zählrate über der kinetischen Energie aufgetragen wird, ändert sich die Position der Auger-Peaks im Gegensatz zu der der Photoelektronen nicht, weil sie nicht von der Energie der Quelle abhängt, sondern von der Energie, die durch den Elektronentransfer freigesetzt wird.

Neben dem Vorkommen der einzelnen Elemente kann ebenfalls die quantitative Zusammensetzung der Probe bestimmt werden. Die Intensität der Elektronen eines Elements A ist gegeben durch

$$I_A(X) = f[n(X_i); \eta_P; \sigma_A(h\nu, i, X_i); \lambda(E_{kin}); \cos \Theta; A; T(E_{kin})] \quad \text{Gleichung 40}$$

Der erste Teil der Formel besteht aus Parametern, die aus der Wechselwirkung zwischen den Quanten und den Elektronenorbitalen resultieren, dabei ist η die Photonenflussdichte, σ der Querschnitt der Photonenwechselwirkung und abhängig vom Element X, dem Orbital i und der Energie $h\nu$ und λ die mittlere freie Weglänge. Der zweite Teil enthält Parameter des Instruments: A ist die Akzeptanzfläche, Θ der *take off*-Winkel und T die Transmissionsfunktion des Spektrometers. Die Bestimmung der einzelnen Parameter ist schwierig, aber nicht unbedingt notwendig, da nicht die absolute Atomanzahl $n(X_i)$ eines Elements bestimmt wird, sondern die relative Zusammensetzung der Probenoberfläche, die durch die atomaren Verhältnisse $[X_1]:[X_2]:[X_3]...[X_Z]$ ausgedrückt wird. Dazu werden die unbestimmbaren Parameter des ersten Teils zum relativen Sensitivitätsfaktor (RSF), der sich experimentell bestimmen lässt, zusammengezogen. Die Flächen der Peaks werden mit dem RSF multipliziert, um die Stöchiometrie anzugleichen, wobei es wichtig ist, zunächst den Hintergrund nach Shirley oder Tougaard zu bestimmen und abzuziehen. Θ und A sind für alle Elemente gleich und T wird ebenfalls experimentell bestimmt.

Mittels XPS kann aber auch die chemische Umgebung der Elemente untersucht werden. Dazu werden die Elektronen eines Kern-Orbitals betrachtet. Die Elektronen des Valenzbandes bilden die Bindungen zu anderen Atomen aus, welche die Elektronendichte an den jeweiligen Atomen beeinflussen. Bei einer C-O-Bindung beispielweise wird die Elektronendichte am Kohlenstoff auf Grund der Elektronegativität des Sauerstoffs verringert. Dies kann durch Partialladungen veranschaulicht werden: $C^{\delta+}$ - $O^{\delta-}$. Die Photoelektronen aus dem positiv geladenen Kohlenstoff müssen zusätzlich die anziehenden Coulomb-Wechselwirkungen überwinden und verlieren dabei einen Teil ihrer kinetischen Energie. Folglich besitzen an Sauerstoff gebundene Kohlenstoffe eine höhere Bindungsenergie. Dies zeigt sich in den hochaufgelösten Spektren der jeweiligen Elemente, welche im Idealfall eine Bestimmung der Anteile der Kohlenstoffe in unterschiedlichen chemischen Umgebungen ermöglichen. Oftmals überlagern sich jedoch die einzelnen Signale, so dass die Spektren einen recht hohen Interpretationsfreiraum zulassen und selten Aussagen mit absoluter Sicherheit getroffen werden können.

5 Synthese der Monomere

Die in Kapitel 3.3 vorgestellten Copolymere werden aus den Monomeren *p*-Vinylbenzylphosphonsäurediethylester (VBP), im Folgenden auch Vinylbenzylphosphonat genannt, Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat (DMMEP), Diethoxyethylmethacrylat (DEEMA) und trimethylsilylgeschütztem Hydroxyethylmethacrylat (HEMA-TMS) sowie Glycidylmethacrylat (GMA), die in Abbildung 27 dargestellt sind, hergestellt. GMA ist dabei als einziges kommerziell erhältlich, alle anderen Monomere werden daher im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert oder zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit einer Schutzgruppe versehen. Die einzelnen Reaktionen sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

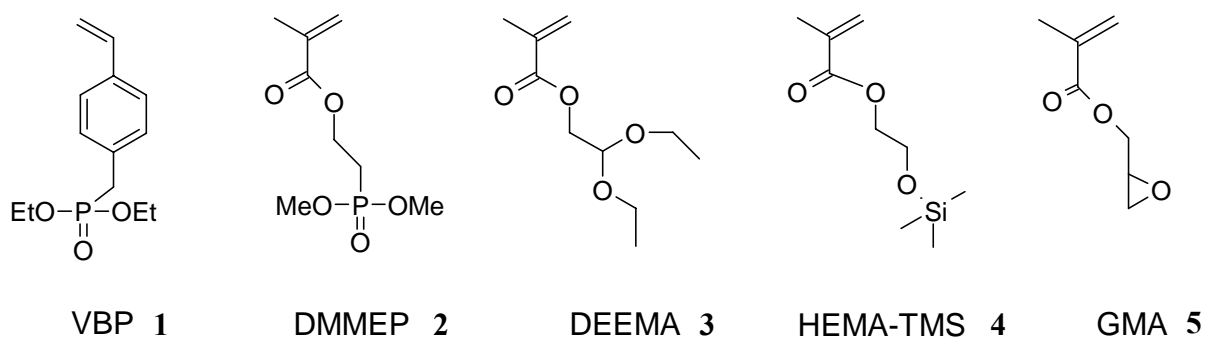


Abbildung 27: Zur Herstellung der Copolymere verwendete Monomere

5.1 Synthese von Vinylbenzylphosphonat

Die Synthese von Vinylbenzylphosphonat **1** erfolgt über die Alkylierung eines Dialkylphosphits nach dem Michaelis-Becker-Mechanismus. Dabei wird zunächst das Phosphit durch eine Base deprotoniert und kann anschließend mit einem Alkylhalogenid umgesetzt werden.^[210] Im vorliegenden Fall wird Diethylphosphit **7** als phosphorhaltige Komponente verwendet, welche zunächst durch die Zugabe von Natriumhydrid deprotoniert wird. Als Alkylhalogenid dient Vinylbenzyljodid **8**, welches zuvor *in situ* aus Vinylbenzylchlorid **6** hergestellt wird, um eine bessere Abgangsgruppe einzuführen.

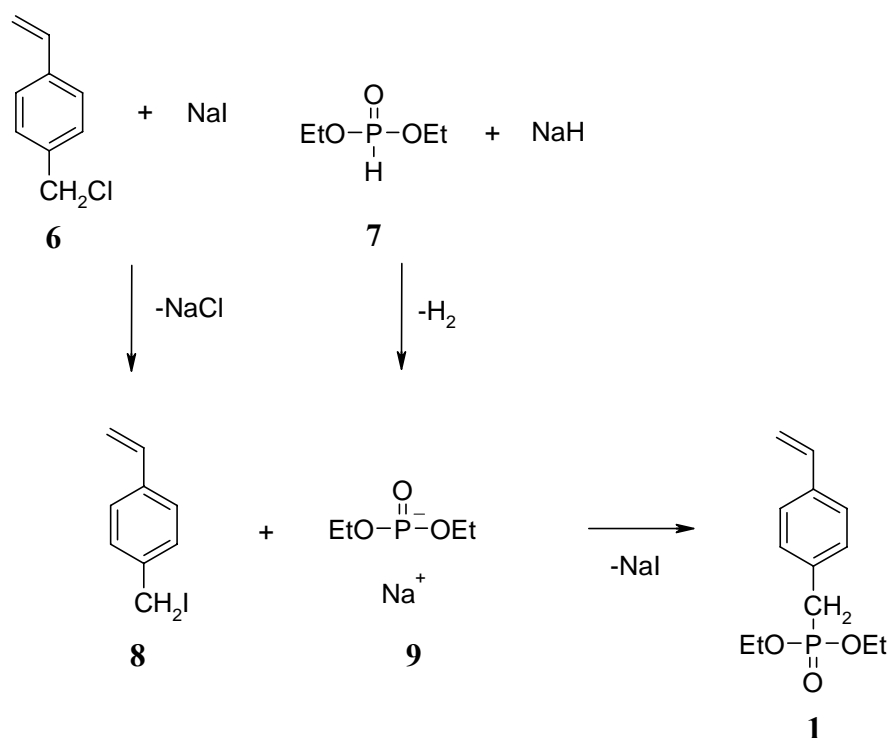


Abbildung 28: Synthese von Vinylbenzylphosphonat **1**

Durch die Reaktion des deprotonierten Diethylphosphits **9** mit Vinylbenzyljodid **8** entsteht schließlich wie in Abbildung 28 dargestellt Vinylbenzylphosphonat **1** mit einer Ausbeute von etwa 60 %. Das erhaltene Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt.

5.2 Synthese von Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat

Zur Herstellung von Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat **2** wird Methacrylsäurechlorid **10** mit Dimethyl-2-hydroxyethylphosphonat **11** versetzt. Durch den Zusatz von Triethylamin als Base wird die Hydroxygruppe des Dimethyl-2-hydroxyethylphosphonats deprotoniert und reagiert in einer Additions-Eliminierungs-Reaktion zum Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat **2**. Die Chlorid-Abgangsgruppe reagiert mit dem zugesetzten Triethylamin zum Ammoniumchlorid und neutralisiert so den entstehenden Halogenwasserstoff.

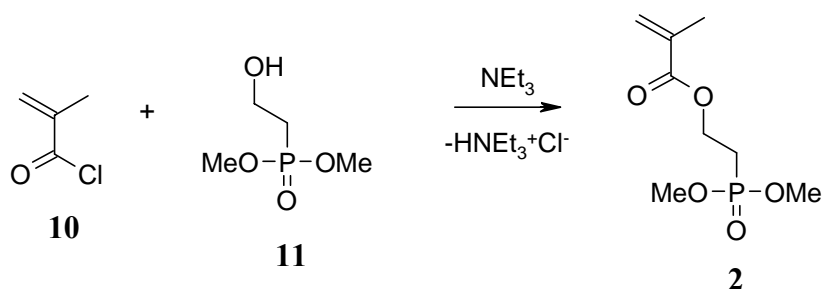


Abbildung 29: Synthese von DMMEP 2

Das entstandene Rohprodukt wird zur Aufreinigung unter Vakuum destilliert, die anschließende Ausbeute beträgt 44 %.

5.3 Synthese von Diethoxyethylmethacrylat

Benachbarte Aldehydgruppen können spontan miteinander zu zyklischen Strukturen, meist Semiacetale, reagieren.^[211] Diese besitzen eine beträchtliche Stabilität und führen zu einer Absenkung der Reaktivität und Löslichkeit. Daher wird für die Copolymerisation das Aldehyd in einer als Acetal geschützten Form verwendet und die Schutzgruppe anschließend wieder entfernt.

Für die Synthese von Diethoxyethylmethacrylat **3** nach ZÁBRANSKÝ et al.^[212] wird zunächst die Vorstufe Kaliummethacrylat **13** hergestellt, die nicht käuflich erhältlich ist. Dazu wird Methacrylsäure **12** in Ethanol mit Kaliumhydroxid neutralisiert.

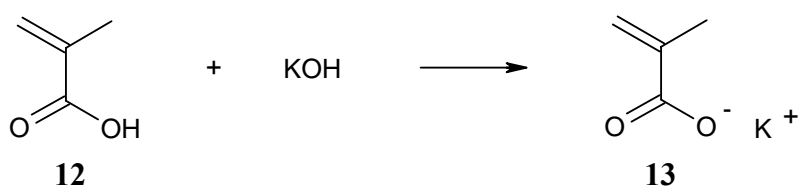
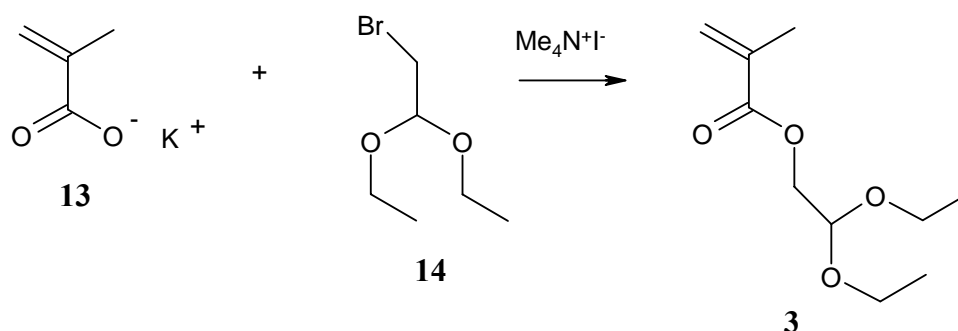


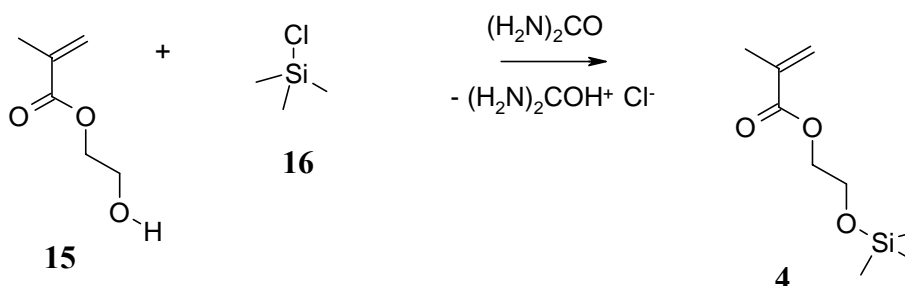
Abbildung 30: Synthese von Kaliummethacrylat

Anschließend wird das entstandene Kaliummethacrylat **13** mit 2-Brom-1,1-Diethoxyethan **14** umgesetzt, wobei durch eine nukleophile Substitution mit Hilfe des Katalysators Tetramethylammoniumiodid das Produkt Diethoxyethylmethacrylat **3** in guter Ausbeute entsteht, welches zur Aufreinigung unter Vakuum destilliert wird.

Abbildung 31: Synthese von Diethoxyethylmethacrylat **3**

5.4 Anbindung einer Schutzgruppe an Hydroxyethylmethacrylat

Obwohl in der Literatur vielfach Hydroxyethylmethacrylat direkt mit dem jeweiligen Comonomer copolymerisiert wird,^[213-215] erschien im vorliegenden Fall die Einführung einer Trimethylsilylschutzgruppe vorteilhaft, um mögliche Nebenreaktionen der Hydroxygruppe zu vermeiden. Dazu wird das Hydroxyethylmethacrylat **15** mit Trimethylsilylchlorid **16** versetzt, der ebenfalls hinzugefügte Harnstoff dient als Chloridionenfänger.

Abbildung 32: Synthese von trimethylsilylgeschütztem Hydroxyethylmethacrylat **4**

Zur Aufreinigung wird das entstandene Produkt zwei Mal unter Vakuum destilliert, die Ausbeute beträgt anschließend etwa 50 %.

6 Copolymerisation und Bestimmung der Parameter

Bei der Arbeit mit Copolymeren ist es von Nutzen, die Zusammensetzung der Copolymere gezielt einstellen zu können. Wenn die Copolymerisationsparameter bekannt sind, kann die Zusammensetzung des Copolymers an Hand der Zusammensetzung der Monomermischung berechnet werden. Daher werden für die in Kapitel 3.3 vorgestellten Copolymersysteme zunächst die Copolymerisationsparameter ermittelt. Dazu wurden die jeweiligen Monomere in verschiedenen Verhältnissen frei radikalisch unter Zusatz von Azobisisobutyronitril (AIBN) als Initiator bei 60 °C miteinander polymerisiert. Die Ausbeuten der Copolymerisationsreaktionen wurden dabei jeweils unter 50 % gehalten, so dass zur Bestimmung der Copolymerisationsparameter die Methode nach KELEN-TÜDÖS^[216] herangezogen werden kann. Die dazu benötigte Zusammensetzung der Copolymere wurde bei Poly-VBP-co-DEEMA, Poly-VBP-co-HEMA-TMS und Poly-VBP-co-GMA mittels ¹H-NMR bestimmt. Da sich die Signale bei Poly-DMMEP-co-HEMA-TMS jedoch sehr stark überlagern, wurde bei diesem Copolymer zunächst der Anteil an Phosphor mittels ICP-OES und anschließend per Elementaranalyse der entsprechende Kohlenstoff-Anteil bestimmt, so dass aus diesen Werten die Zusammensetzung des Copolymers berechnet werden konnte.

6.1 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-diethoxyethylmethacrylat)

Die Aldehyd-Funktion, die für die Anbindung des Proteins verantwortlich ist, kann nicht direkt über ein Monomer in das Copolymer eingebracht werden, da bei der Polymerisation eine Vernetzung auftritt, die das Reaktionsprodukt unlöslich werden lässt. Daher wird das Aldehyd in einer geschützten Form, in diesem Fall als Acetal, verwendet und mit Vinylbenzylphosphonat copolymerisiert. Die r-Parameter werden nach der Methode von KELEN und TÜDÖS bestimmt, da die Ausbeuten größer sind als 5 %, so dass die Methode nach FINEMAN und ROSS nicht mehr geeignet ist. Aus dem Experiment ergeben sich die r-Parameter zu $r_1=0,56$ und $r_2=0,52$. Der grafische Vergleich zwischen den Messwerten und den Werten für die Zusammensetzung, die sich aus den berechneten r-Parametern ergeben, ist in Abbildung 33 dargestellt. Die Kurve, die mit Hilfe der r-Parameter berechnet wurde, beschreibt die Messwerte recht gut. Die r-Parameter sind beide kleiner als eins, so dass die Monomerradikale jeweils bevorzugt mit dem anderen Monomer reagieren und ein annähernd alternierendes Copolymer entsteht. Die Blocklängen betragen in einem weiten Zusammensetzungsbereich zwei Monomereinheiten, erst wenn mehr als 80 % eines Monomers vorhanden sind, steigt die Blocklänge (vgl. Anhang-Abbildung 1).

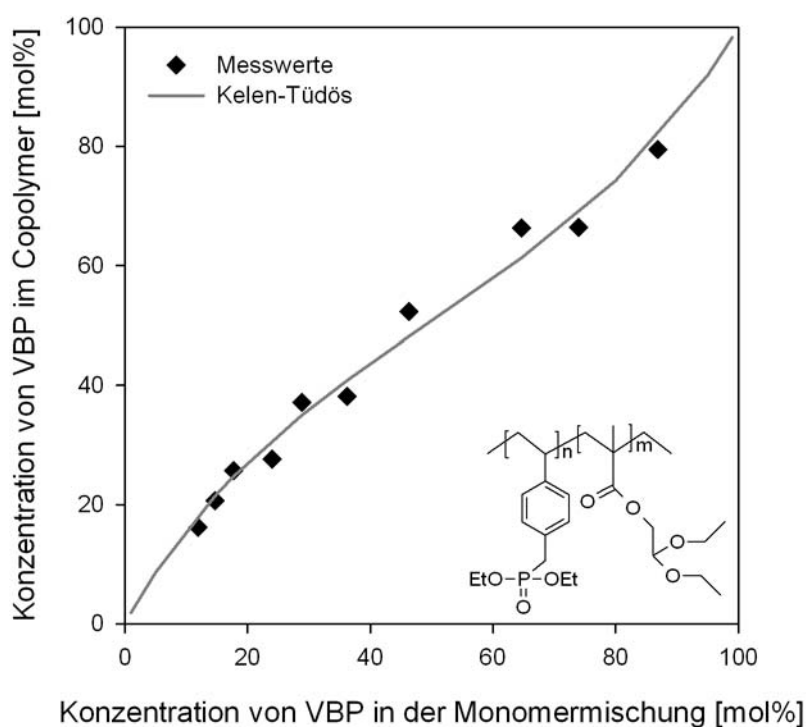


Abbildung 33: Copolymerisationsdiagramm von Poly-VBP-co-DEEMA

6.2 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat)

Um bei der Copolymerisation von Vinylbenzylphosphonat und Hydroxymethylmethacrylat Nebenreaktionen zu vermeiden, wird Hydroxyethylmethacrylat mit einer Trimethylsilyl-Schutzgruppe versehen, so dass die Copolymerisationsparameter für Poly-VBP-co-HEMA nicht bestimmt werden können. Mit Hilfe der Q,e -Werte ist es möglich, zunächst theoretische r -Parameter zu berechnen. Hierzu wurden die Q,e -Werte verwendet, die von PFAFFENROTH experimentell aus den Copolymerisationen von Vinylbenzylphosphonat und trimethylsilylgeschütztem Hydroxyethylmethacrylat mit 4-Vinylpyridin ermittelt wurden.^[217] Dabei ergibt sich $r_1=1,08$ und $r_2=0,78$, die daraus resultierenden Zusammensetzungen sind im Copolymerisationsdiagramm in Abbildung 34 aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die aus den Q,e -Werten ermittelten r -Parameter für eine ideale Zusammensetzung der Copolymere sprechen. Insbesondere der r_1 -Wert ist ungefähr eins, so dass Vinylbenzylphosphonat in dieser Copolymerisation keine oder nur eine geringe Bevorzugung gegenüber einem Monomer zeigt und die Copolymerisation daher annähernd statistisch stattfinden sollte. Zur experimentellen Ermittlung der Copolymerisationsparameter wurde die Zusammensetzung der Copolymere aus den NMR-Spektren bestimmt und daraus die Copolymerisationsparameter mit der Methode nach KELEN-TÜDÖS berechnet. Es ergibt sich

$r_1 = 0,57$ und $r_2 = 0,73$. Beide Copolymerisationsparameter sind kleiner als 1, das heißt, das fremde Monomer wird bevorzugt angelagert. Die experimentell ermittelten Anteile von Vinylbenzylphosphonat im Copolymer und die theoretischen, die aus den Berechnungen mit den r -Parametern resultieren, sind im Copolymerisationsdiagramm in Abbildung 34 vergleichend aufgetragen. Die recht gute Übereinstimmung der experimentellen mit den berechneten Zusammensetzungen deutet auf für die Bestimmung der r -Parameter geeignete Reaktionsbedingungen hin. Die ermittelten Werte liegen recht nah an der aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht dargestellten Diagonale, die eine ideal-statistische Copolymerisation beschreibt, so dass die Abfolge der Monomere annähernd statistisch ist. Insbesondere bei starken Überschüssen eines Monomers in der Monomermischung können dabei aber auch kurze Blöcke eines Monomers gebildet werden.

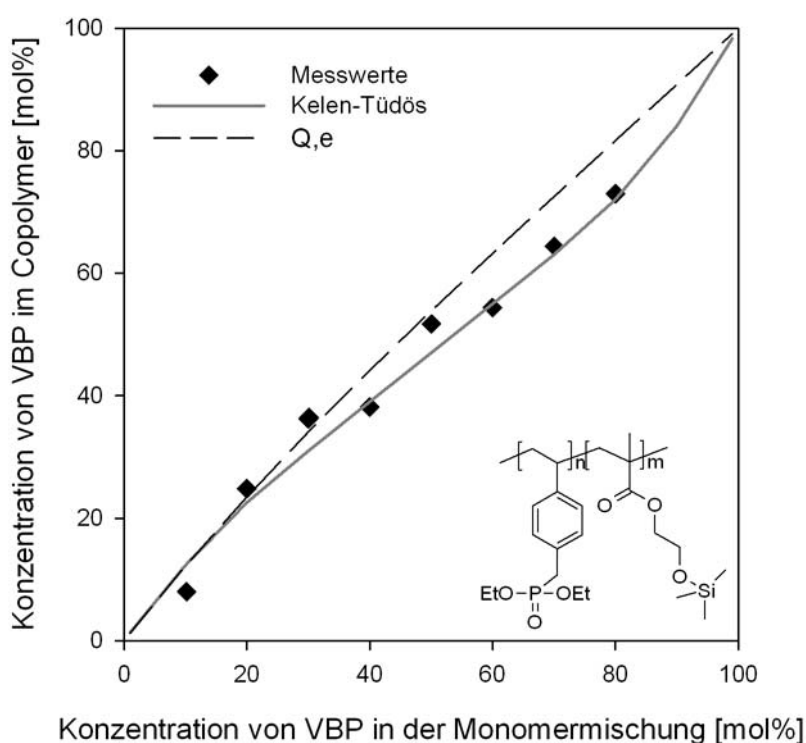


Abbildung 34: Copolymerisationsdiagramm von Poly-VBP-co-HEMA-TMS

Der Unterschied zwischen den experimentell ermittelten Werten und den mit Hilfe des Q,e-Schemas ist gering. Das Q,e-Schema berücksichtigt Resonanzstabilisierungen sowie Polarisierungseffekte, lässt aber mögliche sterische Effekte außer Acht, so dass es sich dabei um eine qualitative Abschätzung handelt, die Ergebnisse jedoch keinesfalls als genaue Vorhersage betrachtet werden dürfen.^[194]

6.3 Poly(dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat)

Bei der Copolymerisation von DMMEP mit HEMA wird ebenfalls trimethylsilylgeschütztes Hydroxyethylmethacrylat verwendet. Die jeweiligen Peaks der Monomere sind in den ^1H -NMR-Spektren überlagert und lassen keine Berechnungen der Zusammensetzung zu, so dass für dieses Copolymer eine andere Methode zur Bestimmung der Zusammensetzung verwendet wird. Der Anteil an Phosphor wird mittels ICP-OES bestimmt und anschließend der Kohlenstoff-Anteil mit Hilfe der Elementaranalyse ermittelt. Aus diesen Werten lassen sich dann die Anteile der jeweiligen Monomere im Copolymer berechnen. Mit Hilfe der Methode nach Kelen-Tüdös (KT) können anschließend die Copolymerisationsparameter bestimmt werden. Dabei ergeben sich die in Tabelle 2 dargestellten Werte.

Tabelle 2: r-Parameter für die Copolymerisation von DMMEP mit HEMA-TMS

	<i>nach KT bestimmt</i>	<i>mit Q,e-Werten berechnet</i>
$r_1(\text{DMMEP})$	0,338	0,796
$r_2(\text{HEMA-TMS})$	1,64	1,529

Ebenfalls in Tabelle 2 aufgelistet sind die r-Parameter, die sich aus der Berechnung mit Hilfe der Q,e-Werte ergeben. Für DMMEP konnten keine Literaturwerte gefunden werden, als Grundlage für die Berechnungen wurden daher die Q,e-Werte verwendet, die bei der Copolymerisation von DMMEP mit DMAEMA ermittelt wurden.^[218] Trotz der Unsicherheiten, die diese Werte besitzen und denjenigen, die der Methode an sich zu Grunde liegen, ist die Tendenz der ermittelten r-Parameter ähnlich. Abbildung 35 zeigt die grafische Auftragung der Zusammensetzungen, die sich aus den jeweiligen r-Parametern ergeben sowie die Messwerte. Diese werden durch die Kurve, die mit Hilfe der r-Parameter berechnet wurde, gut beschrieben.

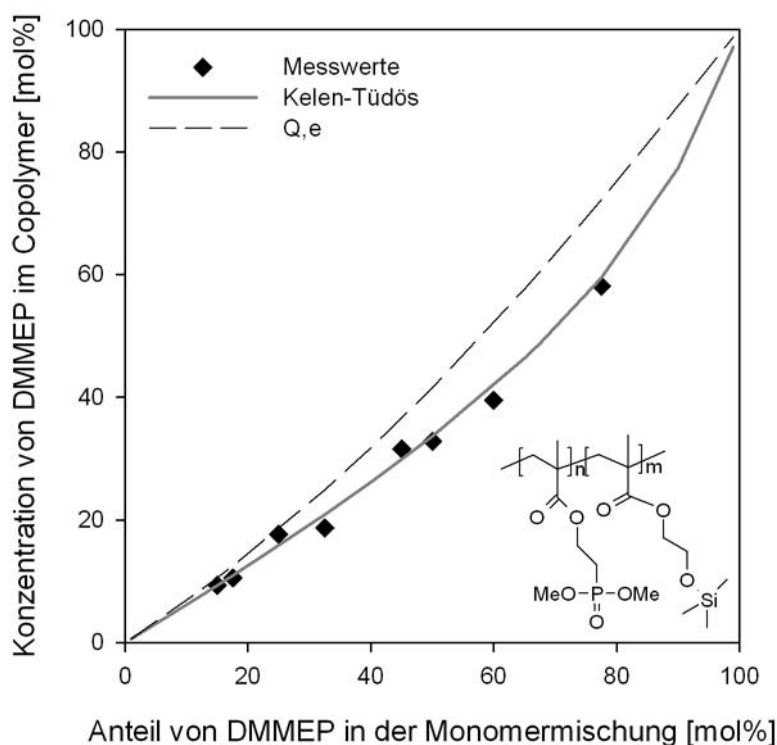


Abbildung 35: Copolymerisationsdiagramm von DMMEP und HEMA-TMS

Für die vorliegende Copolymerisation ist r_1 kleiner als eins und r_2 größer als eins, daher wird das Monomer M_2 , in diesem Fall HEMA-TMS, bevorzugt sowohl an das eigene als auch das fremde Radikal addiert. Dadurch ergeben sich insbesondere bei hohen Anteilen von HEMA-TMS in der Monomermischung längere Blöcke an HEMA-TMS. Dieses Verhalten wird in der Auftragung der Blocklängen über dem Anteil von DMMEP in der Monomermischung (Abbildung 36) deutlich. Sinkt der Anteil an DMMEP in der Monomermischung unter 0,3 mol%, das heißt, steigt der Anteil von HEMA-TMS über 0,7 mol%, nimmt die Länge der HEMA-TMS-Blöcke sprunghaft zu und kann Werte über 30 Monomereinheiten erreichen. Bei der Umsetzung mit CDI könnte dies Auswirkungen auf die Zugänglichkeit der Hydroxygruppen haben, da die voluminösen Imidazolgruppen die Reaktion weiterer Hydroxygruppen mit CDI verhindern.

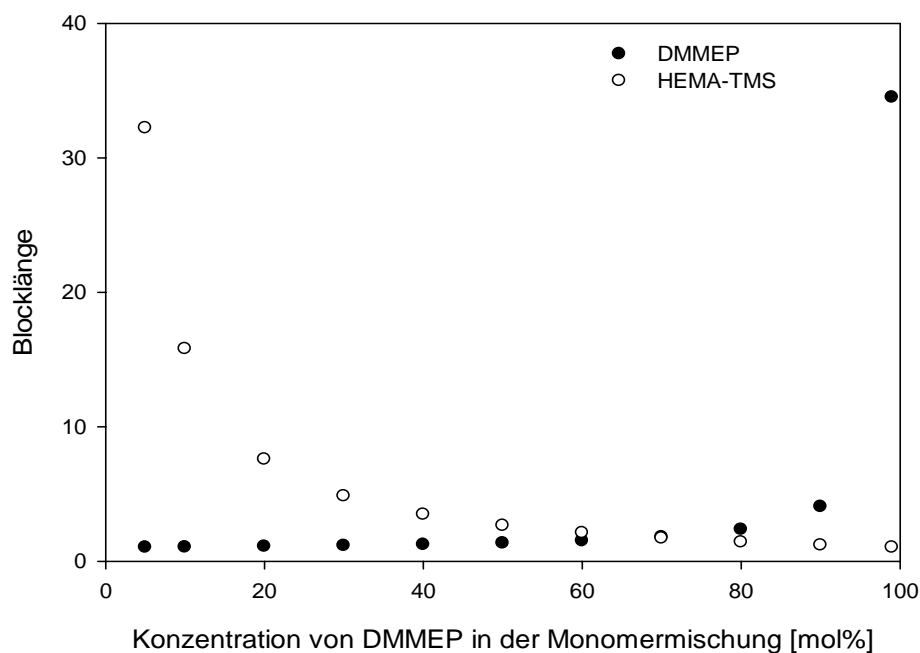


Abbildung 36: Berechnete Blocklängen für die Copolymerisation von DMMEP mit HEMA-TMS

6.4 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-glycidylmethacrylat)

Vinylbenzylphosphonat und Glycidylmethacrylat werden frei radikalisch mit AIBN als Initiator copolymerisiert. Die Zusammensetzungen lassen sich sehr gut mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektren bestimmen, da das Signal der aromatischen Protonen deutlich von den anderen getrennt ist und somit als Referenz verwendet werden kann. Die mit der Methode nach KELEN und TÜDÖS berechneten r -Parameter (siehe Tabelle 3) sind kleiner eins und deuten somit auf einen annähernd alternierenden Einbau der Monomere in die Copolymere hin.

Tabelle 3: r -Parameter für Poly-VBP-co-GMA

	<i>nach KT bestimmt</i>	<i>mit Q, e-Werten berechnet</i>
$r_1(\text{VBP})$	0,152	0,587
$r_2(\text{GMA})$	0,736	0,841

Das Copolymerisationsdiagramm in Abbildung 37 zeigt die experimentellen Daten sowie die Copolymerzusammensetzungen, die sich aus den berechneten r -Parametern ergeben. Die experimentellen Werte liegen nah an der berechneten Kurve, so dass die Qualität der Daten als angemessen betrachtet werden kann. Ebenfalls in Abbildung 37 eingezeichnet sind die

Zusammensetzungen, die mit Hilfe der Q,e-Werte vorhergesagt werden können. Obwohl die r-Werte, die aus den Q,e-Werten berechnet wurden, von den experimentell ermittelten Werten abweichen und nicht diesen deutlichen Unterschied zwischen den Reaktivitäten der einzelnen Monomere widerspiegeln, stimmt die Kurve doch recht gut mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten überein, so dass das Q,e-Schema die tatsächlichen Reaktionseigenschaften für dieses Copolymer sehr gut widerspiegelt.

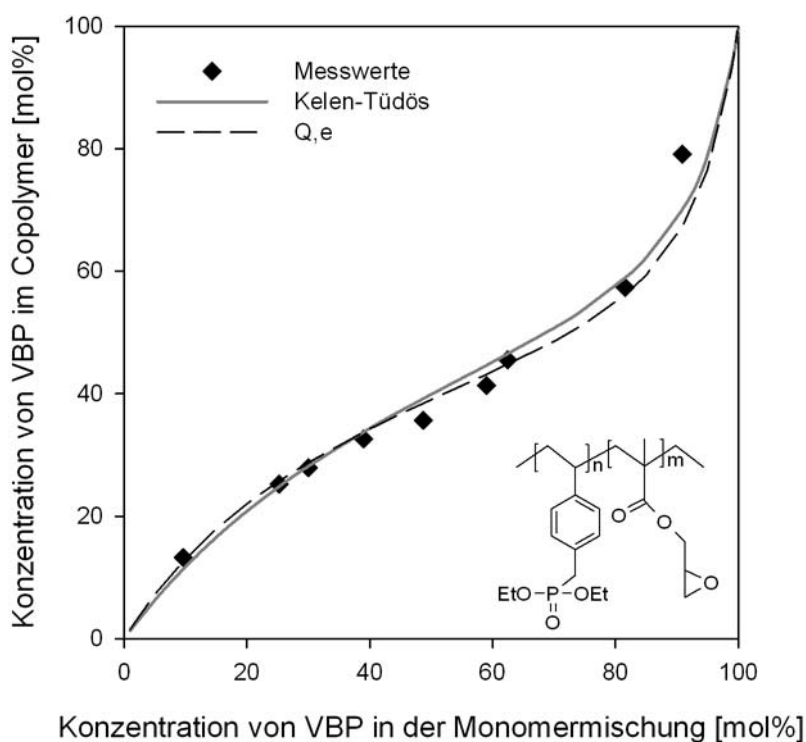


Abbildung 37: Copolymerisationsdiagramm von Poly-VBP-co-GMA

Der Unterschied zwischen den r-Parametern und die daraus resultierende Abweichung der Kurve von der Ideallinie weisen darauf hin, dass die Zusammensetzung zwar annähernd alternierend ist, jedoch auch Tendenzen zur Blockbildung vorhanden sind. Da r_2 um einiges größer ist, wird bevorzugt Glycidylmethacrylat in das Copolymer eingebaut, so dass sich kurze Blöcke von Glycidylmethacrylat bilden können. Nach Gleichung 16 kann die Blocklänge berechnet werden und die Blocklängen sowohl für VBP als auch für GMA sind in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Monomermischung in Abbildung 38 aufgetragen.

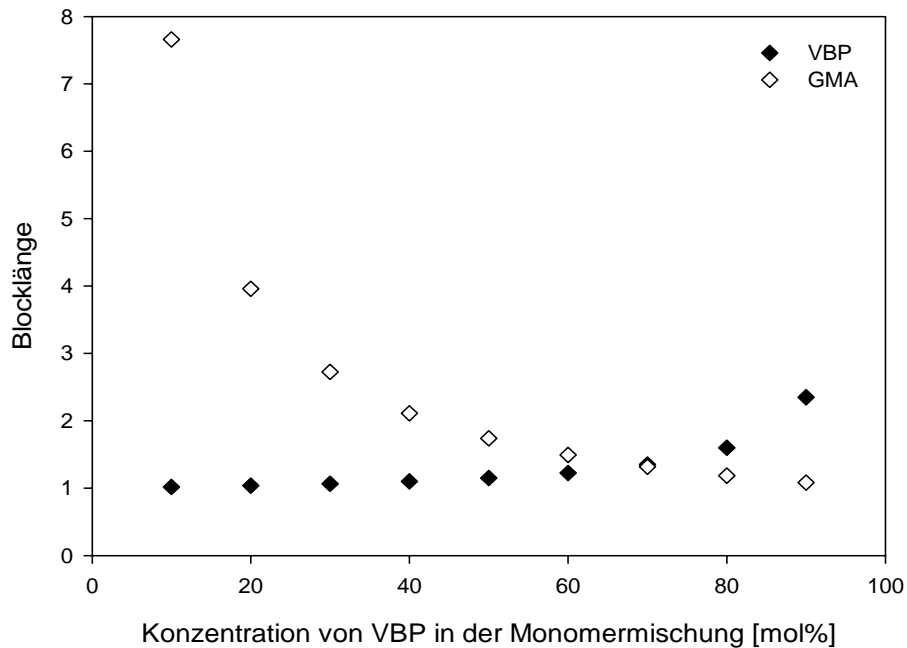


Abbildung 38: Berechnete Blocklängen für die Copolymerisation von VBP mit GMA

Insbesondere bei Reaktionsmischungen mit einem erhöhten Anteil an Glycidylmethacrylat werden also Blöcke von mehr als zwei Monomereinheiten Glycidylmethacrylat gebildet. Dies könnte sowohl Auswirkungen auf die Anordnung der Copolymere auf der Oberfläche als auch auf die Anbindung des Proteins haben. Da die Epoxidgruppen sehr dicht beieinander liegen, kann eine Mehrfach-Anbindung (*multipoint attachment*) des Proteins nicht ausgeschlossen werden.

6.5 Zusammenfassung

Die in Kapitel 3.3.3 vorgestellten Copolymere lassen sich jeweils über einen breiten Zusammensetzungsbereich synthetisieren und bilden dabei weitestgehend annähernd alternierende Copolymere. In den folgenden Kapiteln werden aus den einzelnen Copolymeren Filme auf Titansubstraten hergestellt und im Hinblick auf Schichtdicke, Kontaktwinkel, Zusammensetzung sowie Aktivierung und Immobilisierung des BMP2s charakterisiert.

7 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-diethoxyethylmethacrylat)

Der Einsatz von Aldehydgruppen zur Immobilisierung von Proteinen und Enzymen ist weit verbreitet in der Herstellung von Protein-Rastern für Microarrays^[219-221] und Polymer-Wirkstoff-Konjugaten.^[222, 223] Nach der Reduktion der bei der Reaktion von Aldehyden mit Aminen entstehenden Schiff'schen Base zu einer sekundären Aminbindung ist die Verbindung stabil und wird unter wässrigen Bedingungen nicht hydrolysiert.^[164]

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen wird die Aldehydfunktion hier in Form eines Acetals eingesetzt und das entsprechende Monomer Diethoxyethylmethacrylat mit Vinylbenzylphosphonat copolymerisiert. Aus den Copolymeren unterschiedlicher Zusammensetzung werden anschließend Filme auf Titansubstraten hergestellt und mit verschiedenen analytischen Methoden charakterisiert. Die dabei erhaltenen Resultate werden im Folgenden diskutiert.^{XVI}

7.2 Charakterisierung der Copolymerfilme

7.2.1 Ellipsometrie und Kontaktwinkel

Zur Herstellung der Filme werden die Copolymere im spin-coating-Verfahren auf die Titansubstrate aufgebracht. Für die Schichtdicke wird in Analogie zu den Arbeiten von ADDEN^[96] eine Zunahme mit zunehmendem Anteil an VBP erwartet. Die Bestimmung der Schichtdicke mittels Ellipsometrie zeigt jedoch ein gegenteiliges Verhalten, welches in Abbildung 39 dargestellt ist. Mit steigendem Anteil an VBP ist eine leichte Abnahme der Schichtdicke zu erkennen. Bei einer Zusammensetzung mit 14 mol% VBP wird eine Schichtdicke von $8,3 \pm 1$ nm erhalten, mit einer Zunahme des VBP-Anteils auf 72 mol% sinkt die Schichtdicke auf $6,4 \pm 1$ nm.

^{XVI} Die praktische Durchführung der Copolymerisation sowie die im Folgenden beschriebene Beschichtung der Titanplättchen und die anschließenden Messungen am Ellipsometer und Kontaktwinkelmessgerät wurden von Anne-Kristin Lüttig und Eike Blume während ihrer Vertiefungspraktika durchgeführt.

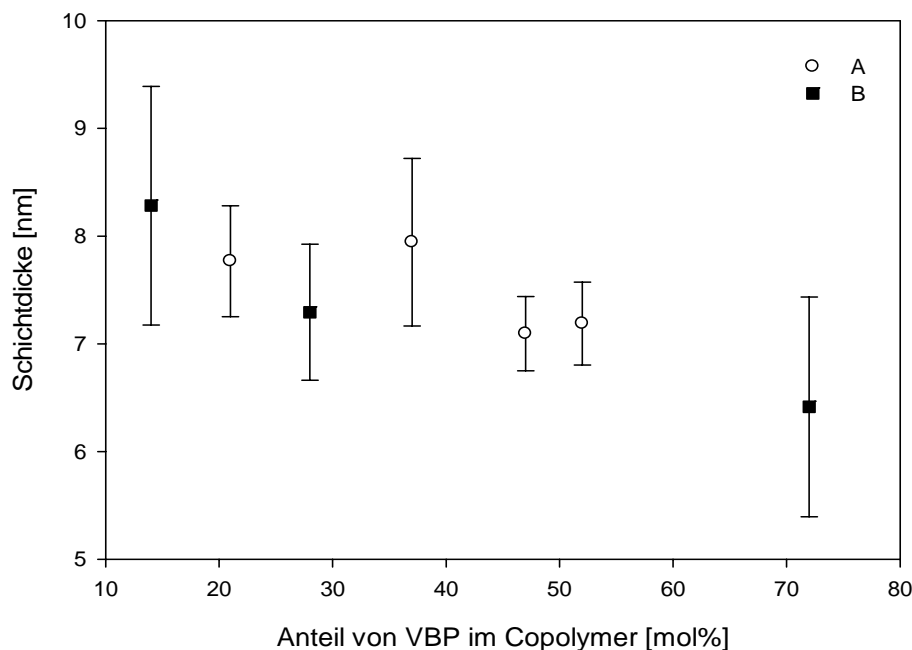


Abbildung 39: Schichtdicke in Abhängigkeit von der Zusammensetzung von Poly-VBP-co-DEEMA

Da die Schichtdicke außerdem abhängig vom Molekulargewicht des Polymers sein sollte,^[61] wurden die entsprechenden Copolymere mittels GPC untersucht. Dabei konnte jedoch das absolute Molekulargewicht nicht bestimmt werden, weil nicht ausreichend Copolymer für eine Bestimmung des Brechungsindexinkrements vorhanden war. Bei der Betrachtung des Lichtstreusignals für die verschiedenen Copolymerzusammensetzungen in Abbildung 40 wird dennoch deutlich, dass die Retentionszeit mit steigendem Anteil an VBP steigt, das heißt, der hydrodynamische Radius geringer wird. Neben den uneinheitlichen Molekulargewichten könnte dies auch auf die unterschiedlichen Raumforderungen der Monomere zurückgeführt werden. Auf Grund der Ethoxygruppen nimmt das Acetal vermutlich mehr Raum ein als das VBP, so dass ein hoher Anteil an DEEMA zu einem größeren Volumen des Moleküls führen würde. Ein hoher Anteil an VBP hingegen würde stärkere Wechselwirkungen zwischen den Phenylringen erlauben, so dass das Polymer eine kompaktere Konformation einnehmen könnte.

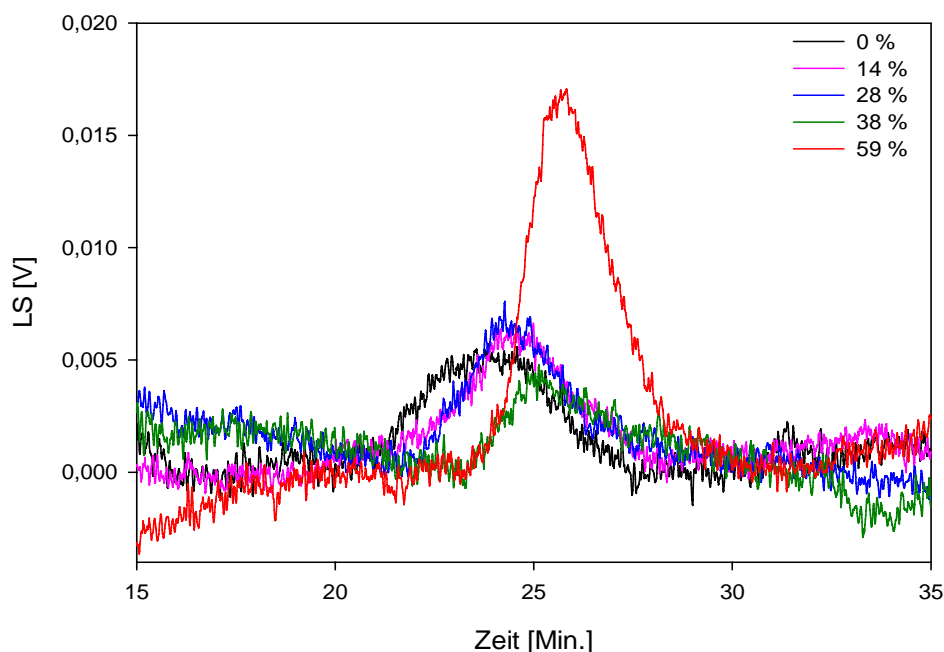


Abbildung 40: Lichtstreusignal von Poly-VBP-co-DEEMA mit verschiedenen Anteilen an VBP

Im Vergleich mit Polystyrol-Standards können die Molekulargewichte ungefähr abgeschätzt werden, so dass auch eine Gegenüberstellung der Zahlenwerte möglich ist. Tabelle 4 enthält die Molekulargewichte sowie die Schichtdicken in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Copolymers. Trotz der geringen Anzahl an Datenpaaren ist zu erkennen, dass die Schichtdicke bei geringeren Molekulargewichten abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass im Gegensatz zu Poly-VBP-co-NASI die Schichtdicke nicht von der Zusammensetzung,^[96] sondern eher durch das Volumen beziehungsweise das Molekulargewicht der Polymermoleküle bestimmt wird.

Tabelle 4: Molekulargewichte und Schichtdicken in Abhängigkeit von der Konzentration von VBP im Copolymer

<i>Anteil VBP</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>d [nm]</i>
0	125 000	-
14	146 000	$8,3 \pm 1$
28	89 000	$7,3 \pm 1$
37	87 000	$7,9 \pm 1$
59	53 150	-

Für die in Abbildung 39 verwendeten Messreihen wurden ebenfalls die Kontaktwinkel zur Einschätzung der Hydrophilie der Oberflächen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

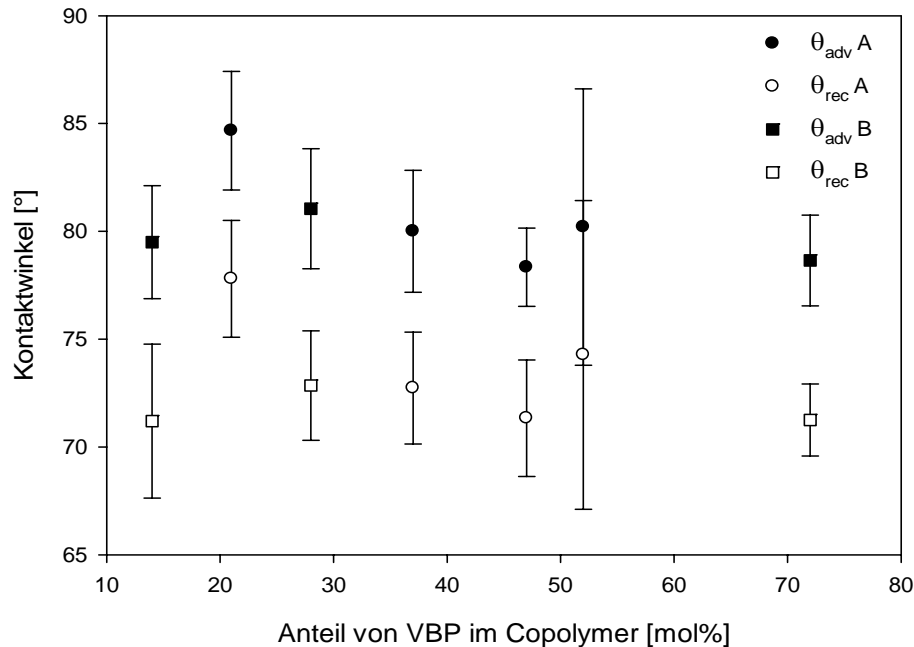


Abbildung 41: Kontaktwinkel in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Poly-VBP-co-DEEMA

Auf Grund der Hydrophobie des VBP wird für die Kontaktwinkel mit steigendem Anteil an VBP eine Zunahme erwartet. Dies kann jedoch nicht beobachtet werden, stattdessen sind die Werte annähernd konstant. Eine mögliche Erklärung liefern die Kontaktwinkel von Filmen der Homopolymere: CHRISTMAN fand bei Bürsten aus Poly(3,3'-diethoxypropylmethacrylat), also einem um eine Methyleneinheit verlängerten Monomer, einen Kontaktwinkel von $88 \pm 1^\circ$.^[224] ADDEN beobachtete bei einem mit Hilfe eines Benzophenon-Ankers auf Titan aufgetragenen Film aus Poly-VBP einen Kontaktwinkel von $\theta_{adv} = 73^\circ$, $\theta_{rec} = 36^\circ$.^[193] Der geringe Unterschied in der Hydrophobie bewirkt dann bei unterschiedlichen Zusammensetzungen des Copolymers vermutlich keine deutliche Änderung des Kontaktwinkels, was zu den beobachteten Ergebnissen führt.

7.2.2 XPS von unbehandeltem Titan

Für die Charakterisierung mittels XPS wurden als Referenz zunächst unbehandelte Titansubstrate untersucht, ein Übersichtsspektrum ist exemplarisch in Abbildung 42 dargestellt. Neben den erwarteten Signalen für Titan und Sauerstoff aus der Oxidschicht wird außerdem ein deutlicher Anteil Kohlenstoff bestimmt, der durch Verunreinigungen mit Kohlenwasserstoffen verursacht wird. Des Weiteren kann auf einigen Plättchen das in der

Legierung enthaltene Aluminium nachgewiesen werden sowie Verunreinigungen mit Stickstoff oder Silizium, die mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen übereinstimmen.^[6, 86, 225] Ebenfalls in der Literatur beschrieben werden Kontaminationen mit Kalzium und Zink,^[225] diese konnten gleichermaßen auf zwei Plättchen aus einer Messreihe detektiert werden, jedoch ist der Ursprung bisher unklar.

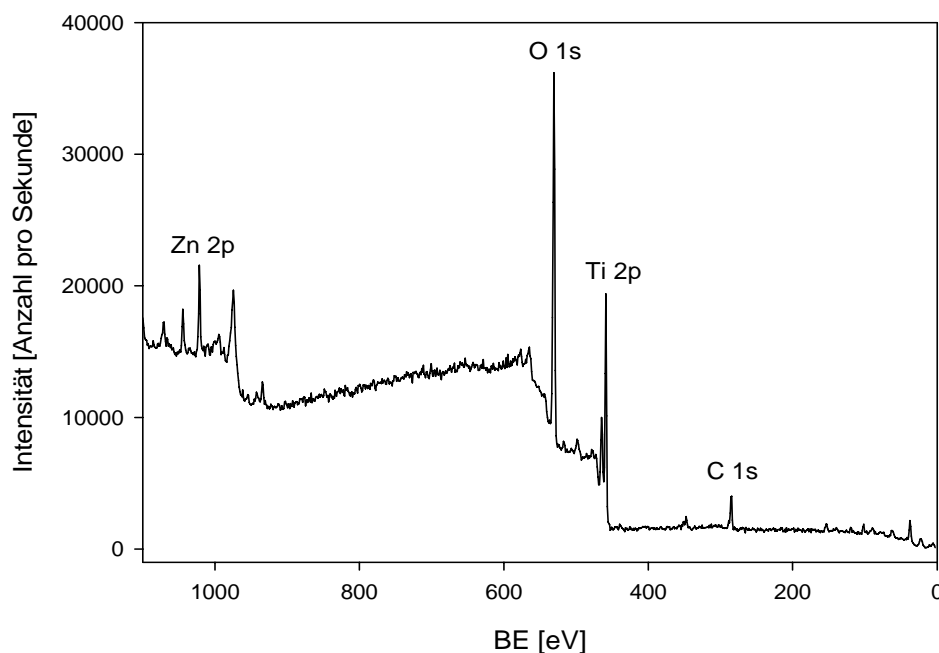


Abbildung 42: Übersichtsspektrum von unbehandeltem Titanplättchen 3

Für eine quantitative Auswertung der Ergebnisse wurden die Kontaminationen mit anderen Elementen herausgerechnet und die erhaltenen Anteile von Titan, Kohlenstoff und Sauerstoff in Tabelle 5 dargestellt. Zum Vergleich sind außerdem die von SITTIG et al.^[225] bestimmten Anteile aufgelistet. Die von ihnen polierten Proben wurden nach der Politur mit Ethanol, Wasser, 1 Minute mit Salpetersäure und erneut mit Wasser gewaschen. Zur Passivierung wurde die Behandlung mit Salpetersäure auf 30 Minuten ausgedehnt. Anschließend wurden die Proben bis zur Messung in Aluminiumfolie gewickelt gelagert.

Tabelle 5: Anteile an Titan, Kohlenstoff und Sauerstoff auf den unbehandelten Titanplättchen 1-6 im Vergleich mit den Literaturwerten von SITTIG et al.^[225]

<i>Element</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>Ti6Al4V poliert^[225]</i>	<i>Ti6Al4V passiviert^[225]</i>
Ti	20,22	16,61	16,43	20,70	16,75	22,77	15,2	20,44
C	19,89	19,86	21,34	20,61	25,2	27,32	33,29	25,34
O	59,88	63,52	62,22	58,68	58,04	49,9	51,48	54,2

Die experimentell ermittelten Anteile an Titan, Kohlenstoff und Sauerstoff liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie die von SITTIG et al. bestimmten Werte. Da die Photoelektronenspektroskopie eine sehr sensitive Methode ist, können die Abweichungen leicht mit den unterschiedlichen Vorbehandlungen, das heißt der Politur, den Waschvorgängen und der anschließenden Lagerung, begründet werden.

Die hochaufgelösten Spektren von Kohlenstoff und Sauerstoff liefern weitere Informationen über die Zusammensetzung der Kontaminationen. Im C-Spektrum konnten drei unterschiedliche Signale identifiziert werden. Das Signal bei 285 eV entsteht durch Verunreinigungen mit Kohlenwasserstoffen, ein geringerer Anteil an Verunreinigungen mit Alkoholen spiegelt sich im Signal bei 286,5 eV wider und das Signal bei ca. 289 eV wird durch die Carbonylgruppe in Carbonsäuren und Estern verursacht. Ähnliche Verunreinigungen werden ebenfalls in der Literatur^[6, 86] beschrieben. Im Sauerstoff-Spektrum ist der Anteil des Sauerstoffes aus der natürlichen Oxidschicht (530 eV) am größten, weitere Signale entstehen durch OH-Gruppen (531,6 eV) auf der Oberfläche oder Carboxylverbindungen und chemisorbiertes Wasser oder Ether bei ca. 533 eV.^[6, 86]

7.2.3 Charakterisierung der Copolymerfilme mittels XPS

Die aus Poly-VBP-co-DEEMA mit unterschiedlichen Anteilen an VBP hergestellten Filme wurden mittels XPS untersucht. Die ermittelten Anteile an Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor sowie die theoretischen Erwartungswerte sind in Abbildung 43 dargestellt. Es fällt auf, dass die gemessenen Konzentrationen an Kohlenstoff stets geringer sind als die Erwartungswerte, der Sauerstoff hingegen überbestimmt ist. Bei dem Anteil an Phosphor ist keine Tendenz sichtbar, da sowohl ein geringerer Anteil als auch ein höherer Anteil bestimmt wird als erwartet. Die Abweichungen liegen jedoch für alle Elemente im Rahmen der Messungenauigkeit, so dass die Ergebnisse die erwartete Zusammensetzung der Filme bestätigen. Eine Änderung der Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung ist in diesem Fall nicht zu beobachten, da diese auf Grund der geringen Unterschiede in der Zusammensetzung innerhalb der Messungenauigkeit liegen.

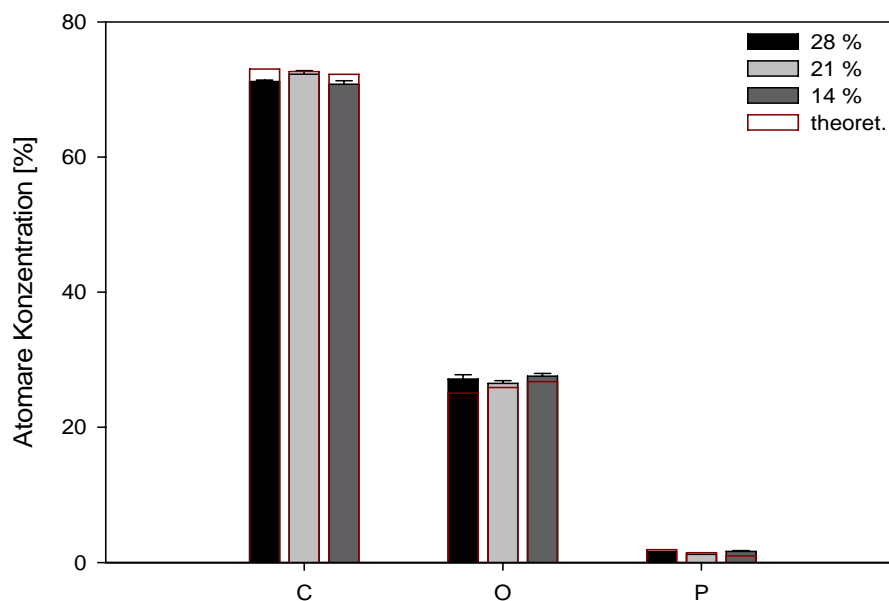


Abbildung 43: Atomare Konzentrationen von Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor in Filmen aus Poly-VBP-co-DEEMA mit unterschiedlichen Anteilen an VBP

7.3 Entfernen der Schutzgruppe

Um Nebenreaktionen während der Copolymerisation zu vermeiden, wurde die Aldehydfunktion im Monomer als Acetal geschützt. Das Entfernen der Schutzgruppe in Lösung führte zu einem unlöslichen Produkt, was auch von LI et al. bei der Hydrolyse von Poly(3,3'-diethoxypropylmethacrylat) beobachtet wurde.^[226] CHRISTMAN et al. konnten jedoch zeigen, dass zur Entfernung der Schutzgruppe in Filmen aus Poly(3,3'-diethoxypropylmethacrylat) eine Behandlung mit 1 M HCl für 15 Minuten ausreicht.^[224] In Anlehnung an CHRISTMAN et al. wurden daher Filme aus Poly-VBP-co-DEEMA mit einem Anteil von 47 % und 21 % VBP für 15 Minuten in 1 M HCl getaucht. Der Vergleich der Kontaktwinkel vor und nach der Behandlung mit HCl ist in Abbildung 44 dargestellt.

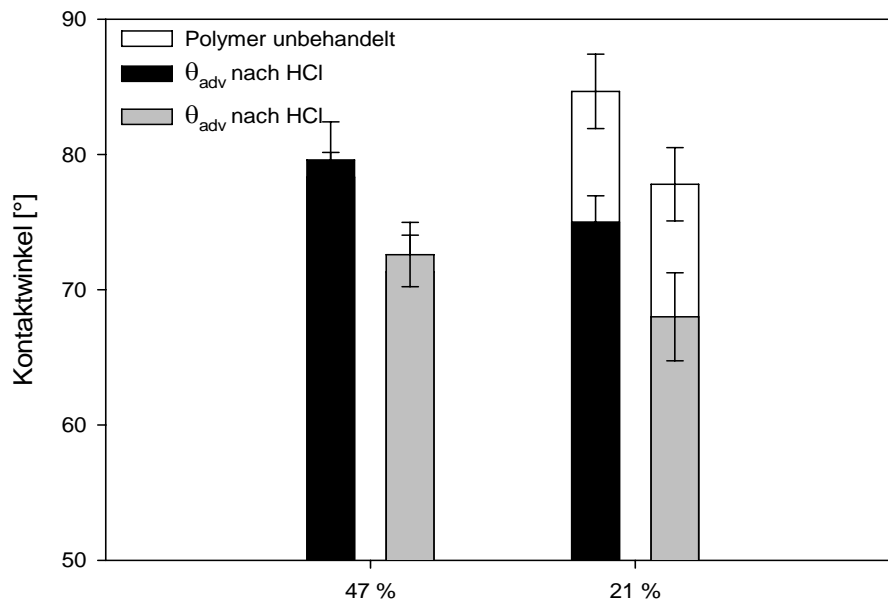


Abbildung 44: Kontaktwinkel vor und nach der Behandlung mit HCl für Filme aus Poly-VBP-co-DEEMA mit unterschiedlichen Anteilen an VBP

Bei einem Anteil von 47 % VBP im Copolymer ist die Änderung sehr gering und liegt im Bereich der Standardabweichung. Die Kontaktwinkel für die Filme aus dem Copolymer mit 21 % VBP zeigen jedoch ein deutliches Absinken nach der Behandlung mit HCl. Der fortschreitende Kontaktwinkel des unbehandelten Copolymers beträgt $85 \pm 3^\circ$, der rückschreitende $78 \pm 3^\circ$. Beide sinken um jeweils 10° auf 75 ± 2 bzw. $68 \pm 3^\circ$. Dies deutet auf einen Anstieg der Hydrophilie der Oberfläche hin und entspricht den Beobachtungen von CHRISTMAN.^[224] Eine genauere Charakterisierung erfolgt mittels XPS. Dazu wurden Filme mit verschiedenen Anteilen an DEEMA entweder in Anlehnung an CHRISTMAN mit HCl oder in Anlehnung an die Synthese des Monomers Formylmethacrylat^[212] mit Phosphorsäure behandelt und die Zeiten zwischen 15, 60 und 120 Minuten variiert.

Tabelle 6 zeigt die atomaren Konzentrationen von Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor, die in einem Übersichtsscan ermittelt wurden, im Vergleich mit den aus der Zusammensetzung der Copolymere theoretisch berechneten Konzentrationen. Standardabweichungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Tabelle eingetragen, sie betragen für Kohlenstoff zwischen 0,21 und 0,71 %, für Sauerstoff 0,2 - 0,6 % und für Phosphor maximal 0,1 %. Eine Aussage über eine Reaktion des Acetals wird jedoch durch die recht ähnlichen atomaren Konzentrationen der Elemente im acetal- und aldehydhaltigen Film erschwert. Für einen Anteil von 28 % VBP im Copolymer ist zu beobachten, dass der Messwert des unbehandelten Films nicht sehr gut mit den Erwartungswerten des Acetals übereinstimmt. Die

Konzentrationen in den mit Säure behandelten Filmen (A1-A4) weisen nur sehr geringe Änderungen im Vergleich zu dem unbehandelten Film auf, so dass höchstwahrscheinlich keine Reaktion oder nur in sehr geringem Umfang stattgefunden hat. Auch bei einem Anteil von 21 % VBP im Copolymer tritt bei der Behandlung mit Säure (Proben B1-B2) kaum eine Veränderung der Konzentrationen auf, die Anteile passen hingegen sehr gut zu den Erwartungswerten für den acetalhaltigen Film. Sowohl die atomaren Konzentrationen der Elemente in dem unbehandelten Film des Copolymers mit einem Anteil von 14 % VBP als auch einige der mit Säure behandelten Filme (C1-C5) weichen deutlich von den Erwartungswerten für den acetalhaltigen Film ab und deuten darauf hin, dass in diesen Fällen möglicherweise eine Umsetzung zum Aldehyd stattgefunden hat.

Tabelle 6: Anteile von Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor auf unbehandelten und behandelten Plättchen im Vergleich mit den theoretischen

	<i>Messwert unbehandelt</i>			<i>Acetal theoret.</i>			<i>Messwert</i>			<i>Aldehyd theoret.</i>		
	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>O</i>	<i>P</i>
28 % VBP	71,19	27,16	1,65	73,05	25,07	1,89				70,82	26,69	2,49
A1							70,56	27,79	1,65			
A2							71,53	27,02	1,45			
A3							71,64	26,71	1,66			
A4							70,35	27,79	1,86			
21 % VBP	72,28	26,50	1,22	72,66	25,91	1,44				69,94	28,09	1,97
B1							71,08	27,79	1,13			
B2							72,04	26,73	1,22			
14 % VBP	70,79	27,58	1,63	72,26	26,77	0,97				68,97	29,64	1,38
C1							71,03	27,84	1,13			
C2							72,41	26,37	1,22			
C3							71,16	27,70	1,13			
C4							71,76	27,32	0,92			
C5							70,92	28,06	1,01			

Da aus den Übersichtsspektren keine eindeutigen Rückschlüsse gewonnen werden können, werden außerdem die hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren betrachtet. Sowohl im Poly-VBP-co-DEEMA als auch im entschützten Poly-VBP-co-FMMA sind jeweils vier verschiedene Kohlenstoffe enthalten, durch die Entfernung der Schutzgruppe sollten sich

jedoch wie aus Abbildung 45 ersichtlich die Anteile der Kohlenstoffe C₁ bei 285 eV und die des Kohlenstoffs C₂ bei 286,5 eV ändern.

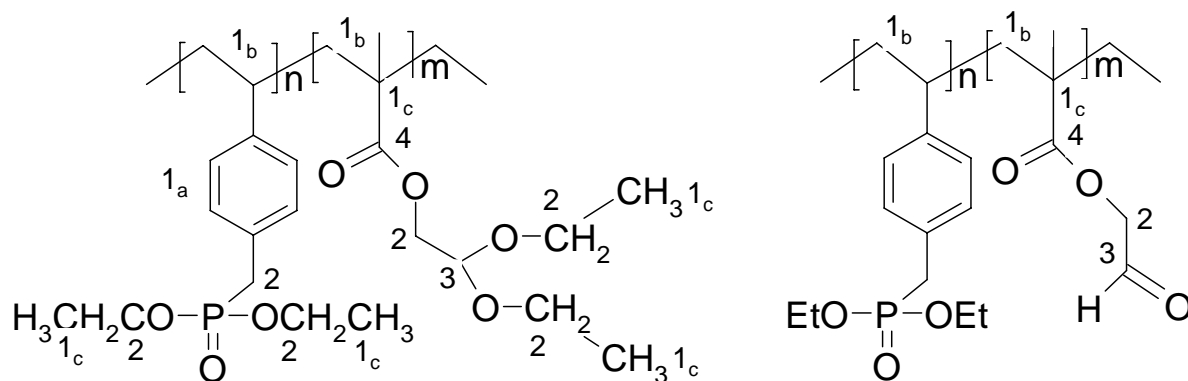


Abbildung 45: Zuordnung der Kohlenstoffe im Copolymer mit der Acetal-Schutzgruppe und mit der Aldehydfunktion

Abbildung 46 zeigt Spektren von unterschiedlich behandelten Filmen von Poly-VBP-co-DEEMA. Dabei fällt auf, dass bei einigen der Peak bei 285 eV etwas verbreitert ist. Da diese Schulter mit den zunächst angenommenen vier verschiedenen Kohlenstoff-Atomen nicht abgebildet werden kann, wurde zum Fit ein weiterer Peak bei 285,5 eV hinzugefügt. Gedanklich wurden die Kohlenstoffe um 285 eV jedoch in drei Peaks unterteilt. Aromatische Kohlenstoffe besitzen eine Verschiebung von -0,34 eV, diejenigen, die als übernächsten Nachbarn ein Sauerstoff besitzen, können eine Verschiebung von 0,2 eV erfahren und Kohlenstoffe neben einer Carbonylgruppe besitzen eine sekundäre Verschiebung von 0,4 eV.^[227]

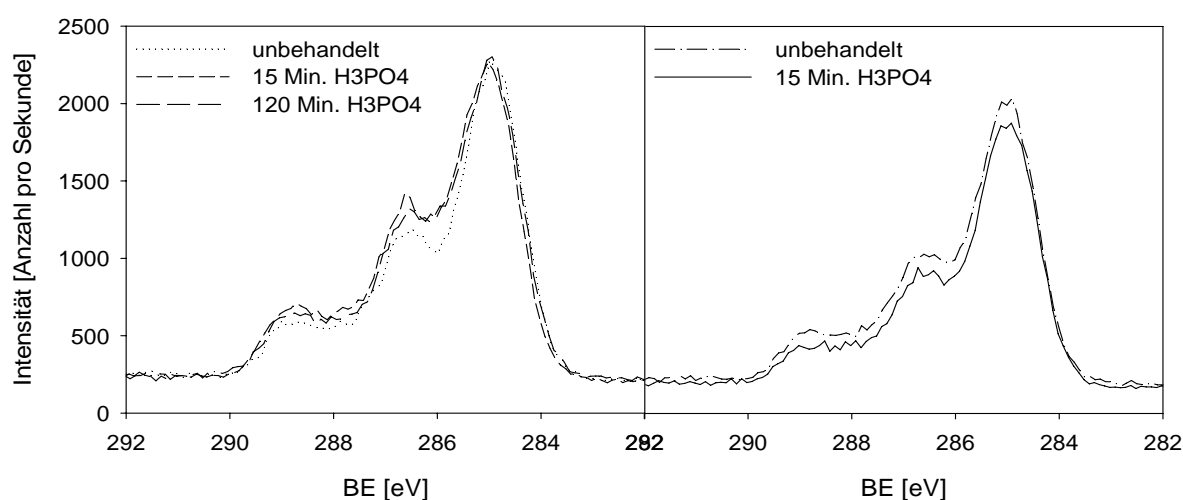


Abbildung 46: Hochaufgelöste Kohlenstoff-Spektren von Filmen aus Poly-VBP-co-DEEMA. A: Copolymer mit 14 % VBP, B: Copolymer mit 28 % VBP.

Abbildung 47 zeigt das Spektrum von Poly-VBP-co-DEEMA mit 14 % VBP und 15 Min. H_3PO_4 mit dem entsprechenden Fit auf fünf Peaks.

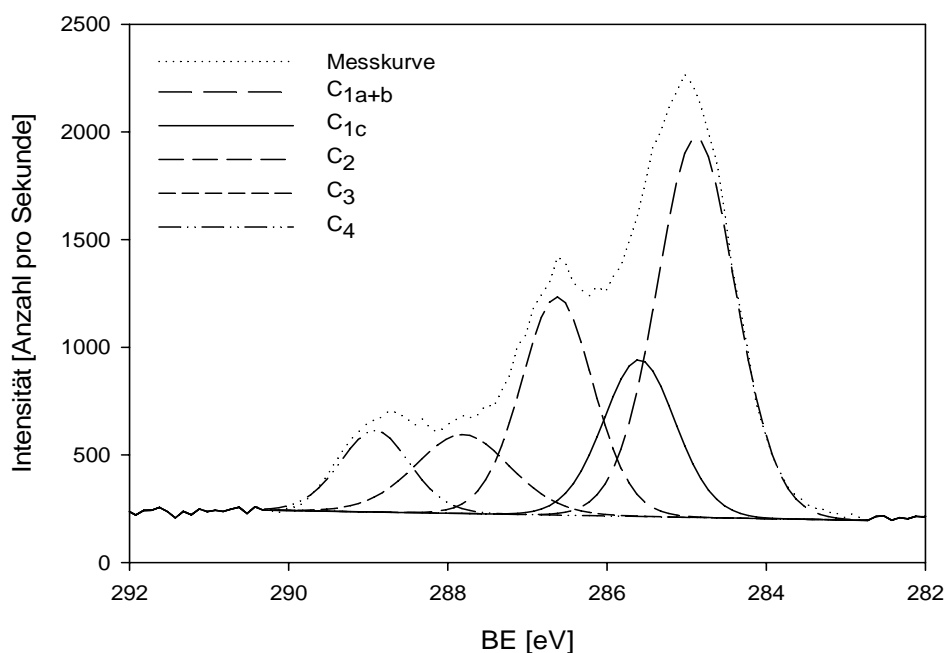


Abbildung 47: Hochaufgelöstes Spektrum eines Films aus Poly-VBP-co-DEEMA mit 14 % VBP und 15 Min. H_3PO_4 mit zusätzlichem Peak für C_{1c}

Davon ausgehend ist in Abbildung 48 der Vergleich der Anteile der unterschiedlichen Kohlenstoffe, die aus den hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren ermittelt wurden, dargestellt. Sowohl für den unbehandelten Copolymerfilm mit 28 % VBP als auch die mit Säure behandelten Filme sind neben dem Messwert die berechneten Erwartungswerte für das unreaktierte Copolymer mit dem Acetal und das vollständig zum Aldehyd umgesetzte Copolymer aufgetragen. Die Zuordnung der Kohlenstoffe wurde wie folgt vorgenommen: C_1 entspricht den Kohlenstoffen mit einer Bindungsenergie von ungefähr 285 eV. Eine weitere Aufteilung ergibt eine Verschiebung von -0,34 eV für die aromatischen Kohlenstoffe (C_{1a}) und eine sekundäre Verschiebung von 0,4 eV für die den Carbonylgruppen benachbarten Kohlenstoffen (C_{1c}), während die Kohlenstoffe mit einem Sauerstoff als übernächstem Nachbarn (C_{1b}) und die des Rückgrats bei 285 eV liegen. Kohlenstoff C_2 entspricht einer Bindungsenergie von 286,5 eV und beschreibt somit die einfach an Sauerstoff gebundenen Kohlenstoffe. C_3 besitzt eine Bindungsenergie von 288 eV und entspricht sowohl den tertiären Kohlenstoff des Acetals als auch dem Carbonylkohlenstoff im Aldehyd. C_4 schließlich spiegelt die Carbonylkohlenstoffe der Methacrylat-Funktion wider und besitzt eine Verschiebung von 289 eV. Eine deutliche Änderung sollte bei einer Umsetzung im Anteil des Kohlenstoffs C_2 zu beobachten sein, da die Anzahl von 3 im Acetal auf 1 im Aldehyd sinkt.

In Abschnitt A der Abbildung 48 sind die Messwerte für den unbehandelten Copolymerfilm dargestellt, welche den Erwartungswerten für den acetalhaltigen Copolymerfilm entsprechen sollten. Die Anteile der Kohlenstoffe C_1 - C_4 passen auch sehr gut zu den Erwartungswerten, einzig die Anteile in der feineren Unterteilung des Kohlenstoffs C_1 stimmen eher mit den Erwartungswerten für das Aldehyd überein. Da die Probe jedoch nicht mit Säure behandelt wurde, sind die Ursachen hierfür eher im Fit zu suchen. Die Messwerte in Abschnitt B und D, die bei einer 15minütigen Behandlung mit Salz- beziehungsweise Phosphorsäure erhalten wurden, stimmen recht gut mit den theoretischen Werten für das acetalhaltige Copolymer überein, so dass für diese Behandlungen noch keine Umsetzung zum Aldehyd zu beobachten ist. Die 60minütige Behandlung mit Salzsäure (Abschnitt C) liefert keine eindeutigen Ergebnisse. Die Anteile der Kohlenstoffe C_1 - C_4 passen recht gut zu Erwartungswerten für das aldehydhaltige Copolymer. Betrachtet man hingegen die Anteile von C_{1a+b} sowie C_{1c} , liegen diese jedoch näher an denen für das acetalhaltige Copolymer. Da es bei diesen Kohlenstoffen jedoch auch schon bei dem unbehandelten Copolymerfilm Unstimmigkeiten gab, wird die Aussagekraft dieser beiden Kohlenstoffe vermindert. Abschnitt E schließlich zeigt die Messwerte, die bei dem Copolymerfilm, der 60 Minuten mit Phosphorsäure behandelt wurde, erhalten wurden. Sowohl bei Kohlenstoff C_1 als auch bei C_2 liegt der Messwert zwischen den beiden Erwartungswerten, was darauf hindeutet, dass möglicherweise eine Umsetzung zum Aldehyd eingesetzt hat, jedoch nicht vollständig abgelaufen ist. Die Anteile von C_{1a+b} und C_{1c} liegen zwar ebenfalls näher an den Erwartungswerten für das aldehydhaltige Copolymer, jedoch außerhalb des logischen Bereiches, so dass hier ebenfalls die Durchführung des Fits anzuzweifeln ist. Ungeachtet der offen bleibenden Frage, ob die Interpretation die Messdaten optimal darstellen kann und daher an einigen Stellen keine eindeutige Aussage machbar ist, scheint an Hand der vorliegenden Daten die erfolgreiche Umsetzung zum Aldehyd eher unwahrscheinlich.

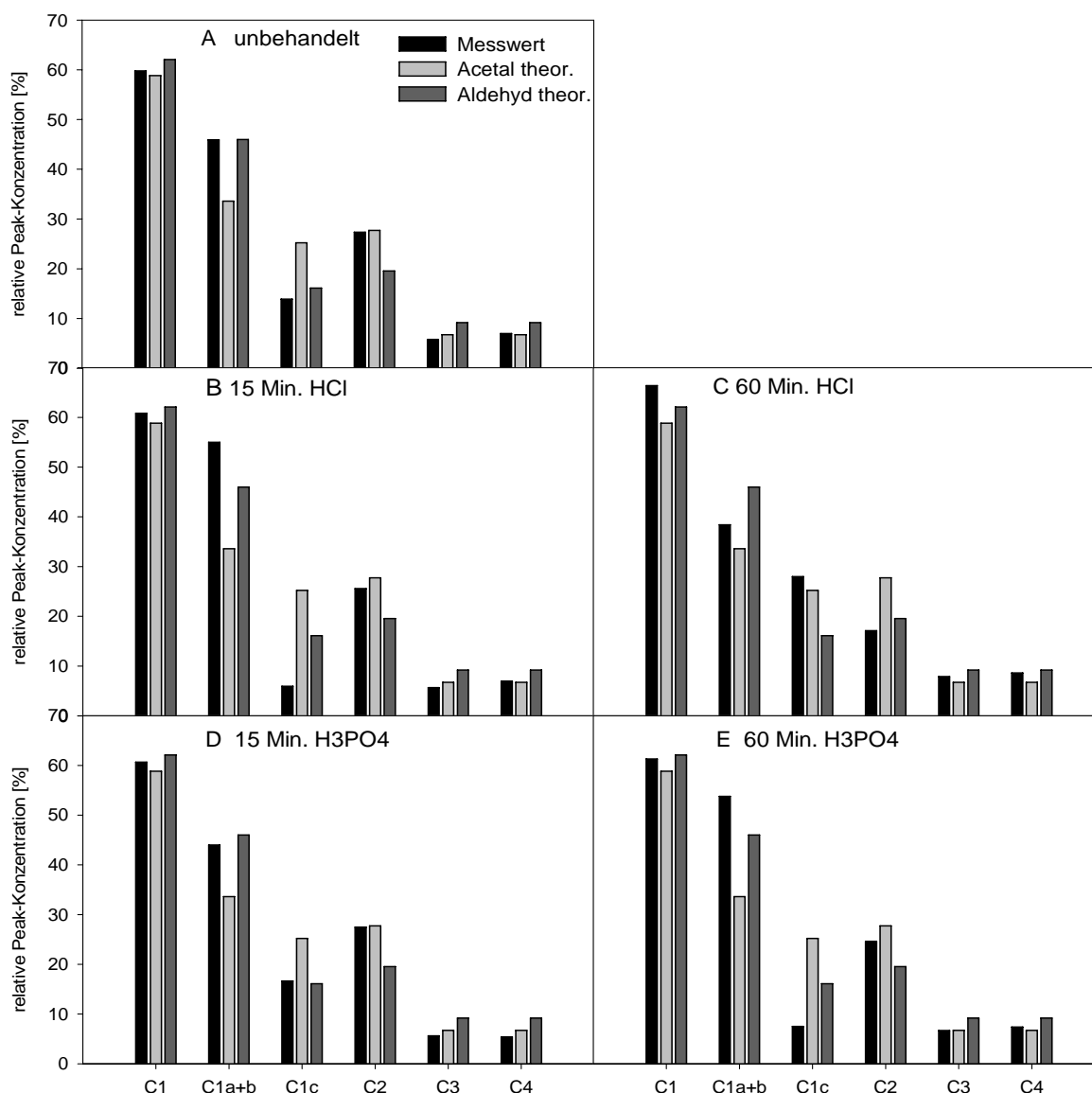


Abbildung 48: Anteile der verschiedenen Kohlenstoffe im unbehandelten sowie mit Säure behandelten Copolymerfilme mit einem Anteil von 28 % VBP

Neben den hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren können ebenfalls die hochaufgelösten Spektren der Sauerstoffe betrachtet werden. Abbildung 49 zeigt das Spektrum des unbehandelten Films von Poly-VBP-co-DEEMA mit 28 % VBP sowie die Spektren der unterschiedlich behandelten Filme. Neben dem Peak bei 530 eV, der dem Sauerstoff der Titanoxidschicht zugewiesen werden kann, tritt nur noch ein weiterer Peak auf, der die Zuordnung der unterschiedlichen Sauerstoffe erschwert. Daher tragen die Spektren der Sauerstoffe nicht weiter zur Aufklärung der Entschätzung bei.

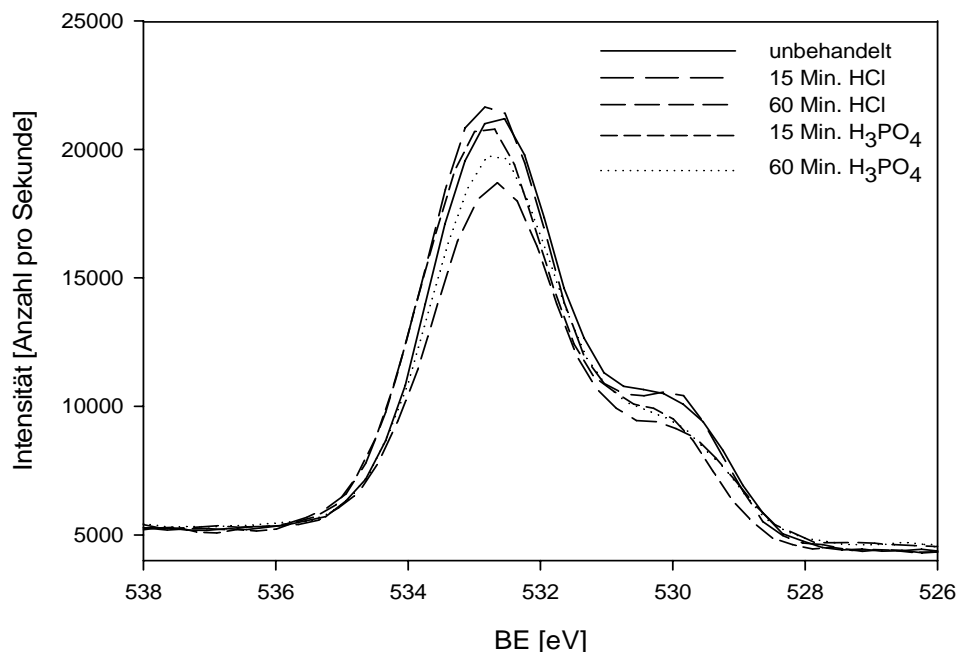


Abbildung 49: Sauerstoff-Spektren vom unbehandelten Copolymerfilm sowie den mit Säure umgesetzten Filmen

In Anlehnung an die Arbeiten von ADDEN^[105] wurde der behandelte Film zur weiteren Überprüfung der Entfernung der Schutzgruppe mit einer Lösung von Trifluorethylamin in PBS-Puffer in Kontakt gebracht. Die anschließend an dem Film durchgeführten XPS-Messungen zeigten keinen oder einen sich an der Detektionsgrenze befindenden Anteil von Fluor oder Stickstoff. Die Kombination aller erhaltenen Ergebnisse zeigt daher, dass die bisher unternommenen Versuche zur Entfernung der Schutzgruppe in den Copolymerfilmen nicht oder eventuell nur in sehr geringem Ausmaß erfolgreich waren. Für weitere Versuche ist neben dem Einsatz stärkerer Säuren, zum Beispiel Trifluoressigsäure,^[226] außerdem die Verwendung eines photoaktiven Säuregenerators möglich. CHRISTMAN et al. benutzen dazu Triphenylsulfoniumtriflat, welches der Lösung zur Herstellung des spin-coating-Films hinzugefügt wird und durch UV-Strahlung in Trifluormethansulfonsäure zerfällt, die das Acetal in ein Aldehyd umwandelt.^[219, 224]

8 Auf der Aktivierung mit CDI basierende Copolymersysteme

Carbonylimidazol kann sowohl zur Aktivierung von Carbonsäuren als auch Hydroxygruppen eingesetzt werden. Bei der Umsetzung mit Hydroxyverbindungen entsteht in guter Ausbeute ein reaktives Imidazolylcarbamate, welches mit aminhaltigen Verbindungen unter Freisetzung von Imidazol zu einer stabilen Carbamat-Bindung reagiert.^[164] Als Monomer mit einer terminalen Hydroxygruppe wird zunächst Hydroxyethylmethacrylat ausgewählt. Mit einer Ethylenglykol-Einheit ist es zunächst der einfachste Vertreter dieser Monomerklasse und bei einem erfolgreichen Einsatz ist es möglich, das System auf Vertreter mit einer längeren Oligo(ethylenglykol)-Einheit zu übertragen, um so einen Spacer zwischen das Polymerrückgrat und das Protein einzubauen. Der Einfluss der Hydrophilie des phosphonattragenden Monomers wird durch die Verwendung des hydrophoben Vinylbenzylphosphonats und des hydrophilen Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonats überprüft. Im Folgenden werden die aus den Copolymeren hergestellten Filme charakterisiert und die dabei erhaltenen Resultate miteinander verglichen.

8.2 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat)

8.2.1 Charakterisierung der Schichten

Bei der Herstellung von Filmen aus Poly-VBP-co-HEMA ergeben sich auf Grund des spin-coating-Prozesses in einigen Fällen Inhomogenitäten in der Schichtdicke, die bereits mit bloßem Auge sichtbar sind. Der Grund hierfür konnte nicht festgestellt werden. In früheren Arbeiten wurden bereits Filme aus dem teilweise entschützten Copolymer hergestellt, die in ihrer Schichtdicke und Abhängigkeit der Schichtdicke von der Zusammensetzung den Erwartungen entsprechen.^[188] Um die Ausbildung der Struktur zu verhindern, wurde daher nach einer alternativen Beschichtungsmethode gesucht. Eine einfache Methode, die sich außerdem für alle Probengeometrien eignet, ist die T-BAG-Methode.^[228] HANSON et al. stellten damit kompakte Phosphonsäureschichten auf Silizium her. Dabei wird das Substrat senkrecht in eine Lösung der Beschichtungssubstanz getaucht und das Lösungsmittel langsam verdampft. Bei der Herstellung von Phosphonat-SAMs auf SiO_2/Si ^[228] und Ti6Al4V ^[229] werden sehr homogene Monoschichten erhalten, für die Beschichtung mit Polymeren scheint es in dieser Form jedoch weniger geeignet zu sein, da die erhaltenen Filme inhomogen und nicht reproduzierbar waren.

Daher wird zur Beschichtung mit Poly-VBP-co-HEMA ein Tauchbad verwendet, in dem die Titanplättchen waagrecht in einer Lösung der Beschichtungssubstanz liegen. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen werden zunächst verschiedene Konzentrationen getestet. Es zeigt sich, dass für das verwendete Copolymer die Schichtdicke von der Konzentration abhängig ist.

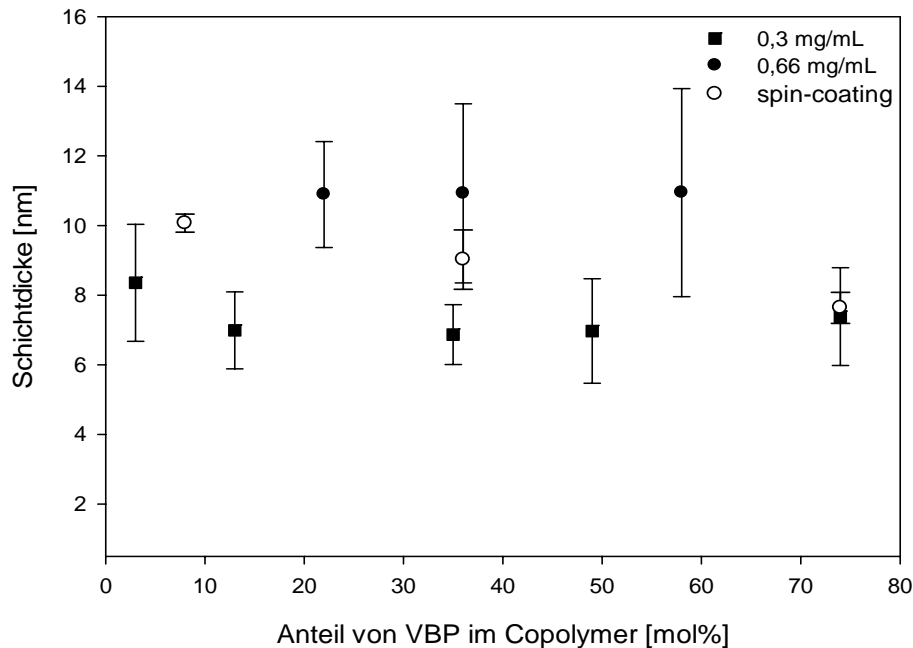


Abbildung 50: Abhängigkeit der Schichtdicke von der Zusammensetzung von Poly-VBP-co-HEMA, Messreihen mit verschiedenen Konzentrationen der Tauchlösung

Bei einer Konzentration von 0,66 mg/mL liegt die Schichtdicke unabhängig von der Zusammensetzung des Copolymers bei etwa 11 nm. Wird eine geringere Konzentration von 0,3 mg/mL verwendet, sinkt die Schichtdicke auf etwa 7 nm und ist innerhalb der Fehlergrenzen für alle Zusammensetzungen nahezu gleich. Zum Vergleich sind in Abbildung 50 ebenfalls die Schichtdicken von spin-coating-Filmen aufgetragen, bei denen keine Struktur ausgebildet wurde. Diese liegen zwischen 10 und 7 nm und weisen außerdem eine Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Copolymere auf, da die Schichtdicke mit steigendem Anteil an VBP im Copolymer sinkt. Unter Nutzung des Einflusses der Konzentration auf die Schichtdicke ist es also möglich, mit Hilfe des Tauchverfahrens Schichtdicken zu erzielen, die im Bereich derer von spin-coating-Filmen liegen. Die Standardabweichungen zeigen jedoch, dass das Tauchverfahren deutlich anfälliger für Inhomogenitäten ist.

Zur genaueren Charakterisierung dieser Inhomogenitäten wurden stichprobenartig AFM-Aufnahmen von Filmen aus Poly-VBP-co-HEMA gemacht. Abbildung 51 zeigt Aufnahmen,

die mit einem Mikroskop am AFM-Gerät aufgenommen wurden. Während bei dem dünnen Film von ca. 6 nm, der aus einer Lösung mit einer Konzentration von 0,3 mg/mL hergestellt wurde (Bild A), sehr deutlich die Riefen des Titans zu erkennen sind, die höchstwahrscheinlich während des Polierens entstanden sind, werden diese durch den dickeren Film von etwa 28 nm, hergestellt mit einer Konzentration von 2 mg/mL, überdeckt (Bild B). Stattdessen ist eine nahezu homogene Verteilung von dunkleren Punkten zu erkennen. Bedingt durch den Aufnahmemodus kann jedoch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob es sich dabei um erhöhte Bereiche, beispielsweise durch Verunreinigungen, oder Vertiefungen handelt, welche auf einen porösen Film hindeuten könnten.

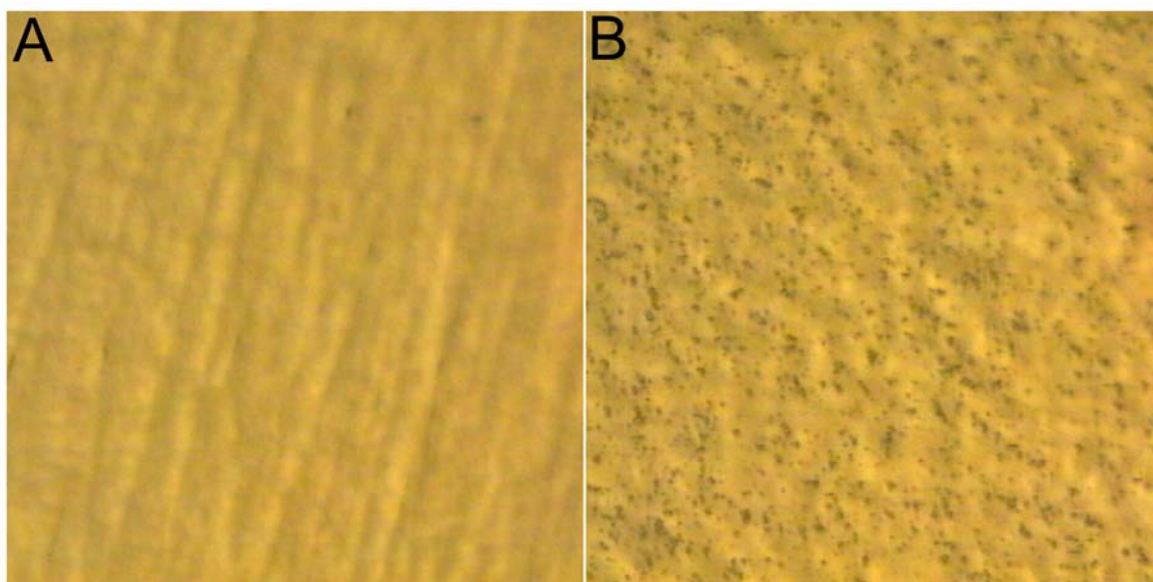


Abbildung 51: Filme aus Poly-VBP-co-HEMA, aufgenommen mit dem AFM-Mikroskop, A: 35 % VBP, c=0,3 mg/mL, 6 nm; B: 8 % VBP, c=2 mg/mL, 28 nm

Die im TappingMode™ an Luft bei Raumtemperatur aufgenommenen AFM-Bilder sind in Abbildung 52 und Abbildung 53 gezeigt. Neben den Höhenprofilen können mit dem AFM auch Phasenbilder aufgenommen werden. Dabei schwingt die Spitze in einer vorgegebenen Frequenz und berührt die Probenoberfläche nicht ständig, sondern nur einmal während jedes Schwingungszyklus. Durch die Berührung mit der Oberfläche verschiebt sich die Phase der Schwingung in Abhängigkeit von den Materialeigenschaften, so dass beispielsweise Aussagen darüber getroffen werden können, ob es sich um eine harte oder weiche Oberfläche handelt. Bild A in Abbildung 52 zeigt zunächst eine Aufnahme des Höhenprofils des dünnen Films (6 nm) mit einer Fläche von 10x10 µm. Der Polymerfilm ist in seiner Dicke nicht homogen, sondern zeigt Differenzen von ca. 60 nm zwischen den Bereichen geringer Schichtdicke und den hell dargestellten erhöhten Flächen. Die Darstellung des Phasenbildes

(B) in der gleichen Größenordnung zeigt eine gleichmäßige Verschiebung der Phase über den untersuchten Bereich, was darauf hindeutet, dass die Oberfläche gleichmäßig mit Copolymer bedeckt ist. Die in Bild C gezeigte Aufnahme der Phasenverschiebung über einen Bereich von ca. $2,7 \times 2,7 \mu\text{m}$ bestätigt die homogene Beschichtung. Die Größe der Partikel lässt sich gut Anhand von Aufnahme D mit einer Kantenlänge von ca. 800 nm abschätzen. Die direkt auf dem Substrat befindliche Schicht besteht dabei zu einem Großteil aus Partikeln mit einem Durchmesser von 3-5 nm, die Aggregate, die sich zusätzlich darauf abgelagert haben, sind bis zu 500 nm groß. Das Copolymer scheint auf der Oberfläche also zunächst eine Monoschicht aus Polymerknäulen auszubilden, auf welcher sich weitere Knäule zu größeren Aggregaten zusammenlagern.

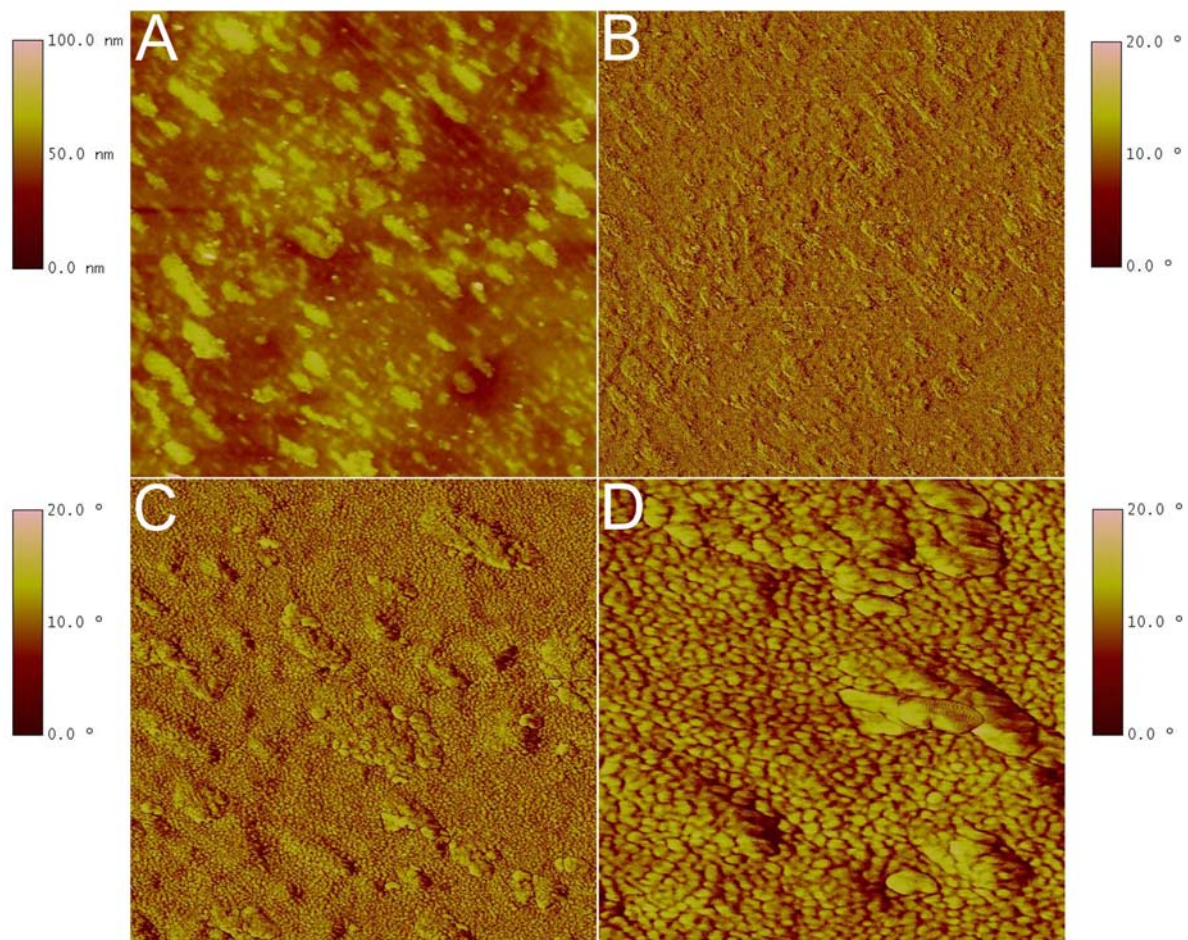


Abbildung 52: AFM-Aufnahmen im TappingMode™ an Luft und bei Raumtemperatur des dünnen Films (6 nm) aus Poly-VBP-co-HEMA. A Höhenprofil, B-D Phasenbilder. Die Kantenlänge der Aufnahme beträgt bei A und B etwa $10 \mu\text{m}$, bei C $2,7 \mu\text{m}$ und bei D etwa 800 nm.

Die Aufnahmen des Films mit einer Schichtdicke von 28 nm sind in Abbildung 53 gezeigt. Bei den Bildern A und C handelt es sich um illuminierte Darstellungen der Höhe. Da für diese

Art der Darstellung keine Skalen angegeben werden können, wurden zur Bestimmung der Partikeldimensionen Sektionsanalysen durchgeführt.

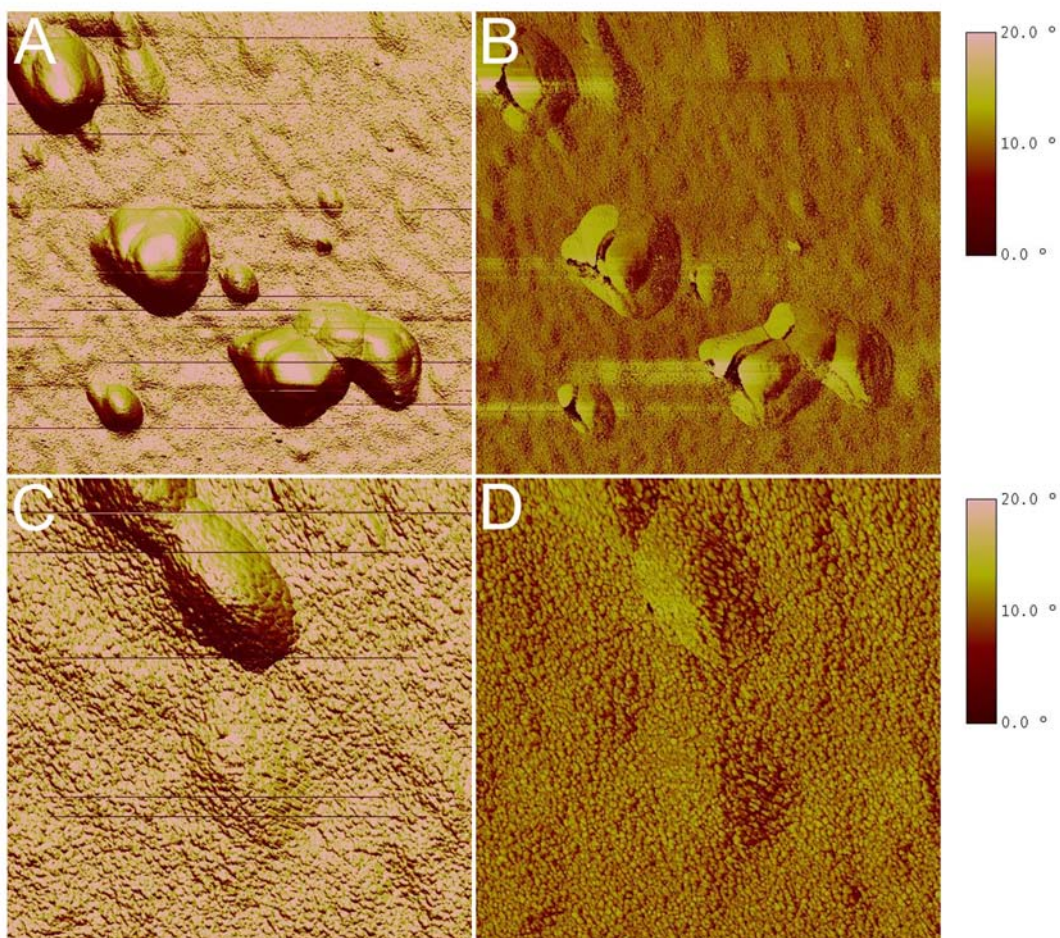


Abbildung 53: AFM-Aufnahmen im TappingMode™ an Luft und bei Raumtemperatur des Films mit einer Schichtdicke von 28 nm, die Kantenlänge beträgt bei A und B etwa 10 μm , bei C und D etwa 3 μm . Erläuterungen siehe Text.

Auch bei dem Film mit einer Schichtdicke von 28 nm deuten sowohl die Aufnahmen der Höhen als auch der Phasenverschiebung darauf hin, dass die Titanoberfläche zunächst gleichmäßig mit Polymerknäulen bedeckt ist. Aus den Sektionsanalysen der Aufnahme A ist jedoch zu erkennen, dass die Aggregate, die sich darauf abgelagert haben, wesentlich größer sind, das heißt bis zu 2,5 μm groß und 350 nm hoch. Auf Grund des Phasenbildes B kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um Verunreinigungen handelt. Die Sektionsanalysen zeigen außerdem, dass die auf Bild B sichtbaren Aufbrüche nicht real sind, da sie sich nicht in den Höhenprofilen widerspiegeln. Die kleineren Erhebungen, die auf den Bildern C und D zu erkennen sind, weisen eine Höhe von ca. 100 nm und eine Breite von etwa 800 nm auf.

Die Betrachtung der AFM-Aufnahmen zeigt, dass durch den Tauchprozess eine homogene Beschichtung von Poly-VBP-co-HEMA auf den Titansubstraten ausgebildet wird. Darauf lagert sich jedoch zusätzliches Copolymer in größeren Aggregaten ab, welche vermutlich zu den beobachteten Inhomogenitäten in der Schichtdicke führen. Auf der Beschichtung, die mit einer Lösung der Konzentration von 0,3 mg/mL hergestellt wurde, sind die Aggregate zwischen 100 und 500 nm groß und scheinen aus einer Zusammenlagerung der Polymerknäule zu bestehen. Die auf dem Film mit einer Schichtdicke von 28 nm beobachteten Partikel sind hingegen bis zu 2,5 µm groß und scheinen eine glattere Oberfläche zu besitzen. Zur Herstellung einer homogenen Monoschicht und zur Vermeidung der Ausbildung von Aggregaten könnte beispielsweise die Konzentration weiter gesenkt werden, dazu sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Die beim spin-coating-Prozess auftretenden Strukturen mit Bereichen mit Schichtdicken von bis zu 60 nm sowie die Abhängigkeit der Schichtdicke von der Konzentration im Tauchprozess weisen darauf hin, dass während des Beschichtungsprozesses noch weitere Vorgänge Einfluss auf die Schichtdicke ausüben. Um mehr über die Anordnung der Polymere auf der Oberfläche zu erfahren, wurden daher erste Untersuchungen zum Quellungsverhalten der Schichten in Wasser durchgeführt. Dabei wurden wegen der homogenen Beschichtung zunächst die Filme aus dem Tauchprozess überprüft. Unabhängig von der Zusammensetzung des Copolymerfilms konnte ein Anstieg der Schichtdicke von ca. 7 nm auf ca. 150 nm beobachtet werden, eine Auflistung der detaillierten Ergebnisse befindet sich im Anhang. Eine derartige Quellung ist üblicherweise bei Hydrogelen zu beobachten, für deren Herstellung vielfach auch HEMA verwendet wird. Dabei wird allerdings mit Hilfe eines Vernetzungsreagenzes ein Netzwerk erzeugt, in dessen Maschen sich das Wasser einlagern kann.^[230] BAYRAMOĞLU et al. konnten jedoch zeigen, dass auch unvernetzte Filme aus Poly(hydroxyethylmethacrylat-co-(ethylenglykol)methacrylat) mit einer Schichtdicke von etwa 600 nm je nach Zusammensetzung in der Lage sind, bis zu 137 % Wasser aufzunehmen.^[231] Da keine weiteren Untersuchungen zur Quellung von Poly-VBP-co-HEMA durchgeführt wurden, ist bislang unklar, ob einzig die von BAYRAMOĞLU postulierte Hydrophilie Einfluss auf die Wasseraufnahme nimmt oder weitere Faktoren wie beispielsweise die Erzeugung eines physikalischen Netzwerkes durch Verschlaufungen beteiligt sind.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Einfluss der TMS-Schutzgruppe. In vorhergehenden Arbeiten^[188] wurden Filme aus Poly-VBP-co-HEMA, bei dem die Schutzgruppe nicht oder nicht vollständig entfernt wurde, mittels spin-coating hergestellt, die ein abweichendes Verhalten zeigen. Dort wurde beobachtet, dass die Schichtdicke mit dem Anteil an VBP im Copolymer ansteigt: Bei einem Anteil von 19 % VBP im Copolymer beträgt die Schichtdicke $6,7 \pm 0,2$ nm, bei einem Anteil von 64 % VBP $9,0 \pm 0,3$ nm. Die Schutzgruppe scheint also eine Nebenreaktion bei der Herstellung der Filme zu verhindern. Der tatsächliche Einfluss und welche Reaktionen bedingt durch ungeschützte Hydroxygruppen auftreten bedarf aber noch weiterer Untersuchungen.

Abbildung 54 zeigt die fortschreitenden Kontaktwinkel für Filme aus Poly-VBP-co-HEMA, die mittels spin-coating und zwei unterschiedlich konzentrierten Tauchlösungen hergestellt wurden.

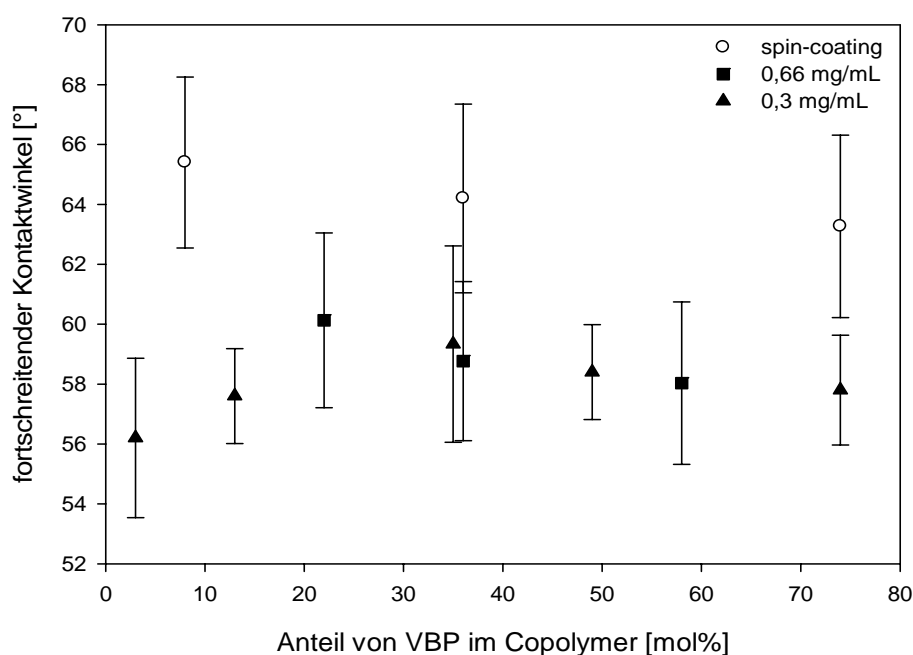


Abbildung 54: Kontaktwinkel für Filme aus Poly-VBP-co-HEMA in Abhängigkeit vom Anteil an VBP und der Konzentration der Beschichtungs-Lösungen

Die Kontaktwinkel der Polymerfilme, die mit Hilfe des Tauchprozesses hergestellt wurden, zeigen weder eine Abhängigkeit von der Copolymerzusammensetzung noch von der Schichtdicke, die auf Grund der unterschiedlichen Konzentration der Polymerlösungen variiert. Die über alle Messungen der Filme, die mit der 0,3 mg/mL Tauchlösung hergestellt wurden, gemittelten Winkel betragen für den fortschreitenden $58 \pm 1^\circ$ und den hier nicht gezeigten rückschreitenden Kontaktwinkel $53 \pm 2^\circ$ (Abbildung im Anhang). Die mittels spin-coating hergestellten Filme besitzen Schichtdicken zwischen denen der über einen

Tauchprozess hergestellten Filme, so dass auch bei den Kontaktwinkeln vergleichbare Werte erwartet werden. Diese sind jedoch deutlich höher, der fortschreitende Kontaktwinkel variiert dabei zwischen 65 und 63° , der rückschreitende zwischen 61 und 59° . Dies deutet darauf hin, dass die Beschichtungsmethode einen Einfluss auf die Anordnung der Copolymere haben könnte. Auf Grund der Belastung während des spin-coating-Prozesses ist es möglich, dass diese nicht in einer zufälligen Knäuel-Konformation vorliegen, sondern eine bevorzugte Orientierung parallel zum Substrat annehmen.^[57] Für eine genauere Aussage bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

8.2.2 Aktivierung

Die Hydroxygruppe von HEMA bietet verschiedene Möglichkeiten zur Aktivierung, um ein Protein anbinden zu können. Im vorliegenden Fall wird die Aktivierung mittels CDI gewählt, da bereits Ergebnisse zur Reaktion auf der Oberfläche sowie zur Anbindung von BMP2 mittels CDI vorliegen. ADDEN et al. konnten zeigen, dass SAMs aus (11-Hydroxyundecyl)phosphonsäure in akzeptabler Ausbeute mit CDI aktiviert werden können und sowohl Trifluorethylamin als Modellsubstanz als auch BMP2 daran anbinden.^[105] Aus diesem Grund wird die Aktivierung von Poly-VBP-co-HEMA unter ähnlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Da CDI bei geringen Wassermengen leicht hydrolysiert wird,^[164] ist es wichtig, die Umsetzung in wasserfreien Medien durchzuführen. Daher wird eine $0,3$ M Lösung von CDI in getrocknetem Dioxan hergestellt und die Titanplättchen damit bedeckt. Die anschließende Charakterisierung erfolgt mittels Kontaktwinkelmessungen und XPS.

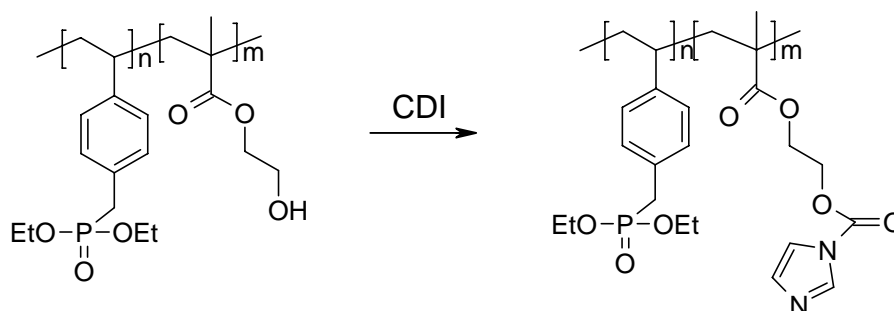


Abbildung 55: Umsetzung von Poly-VBP-co-HEMA mit CDI

Die Kontaktwinkel steigen nach der Behandlung mit CDI im Mittel von $\theta_{adv} = 56 \pm 2^\circ / \theta_{rec} = 51 \pm 4^\circ$ auf $\theta_{adv} = 59 \pm 1^\circ / \theta_{rec} = 54 \pm 2^\circ$, so dass eine Zunahme der Winkel um etwa 3° zu beobachten ist. GONÇALVES et al. konnten bei der Umsetzung von Tetra(ethylenglykol)-Monoschichten mit CDI ebenfalls eine Steigerung der Hydrophobizität beobachten.^[232] Dass

diese im vorliegenden Fall wesentlich geringer ausfällt, kann sowohl auf das geringe Vorkommen der Hydroxy- beziehungsweise Imidazolgruppen auf der Oberfläche als auch auf eine unvollständige Umsetzung hindeuten. Auf Grund der erhaltenen Standardabweichungen lassen die Kontaktwinkelmessungen noch keine eindeutige Aussage zu, daher wurde die Aktivierung mit Hilfe von XPS-Messungen überprüft.

Dazu wurden zunächst Filme der unbehandelten Copolymere in verschiedenen Zusammensetzungen untersucht. In Abbildung 56 findet sich eine Auftragung der atomaren Konzentration der Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor für Poly-VBP-co-HEMA mit steigendem Anteil an VBP im Vergleich zu den theoretisch berechneten Werten. Da jeweils nur eine Messung pro Probe durchgeführt wurde, können keine Standardabweichungen angegeben werden.

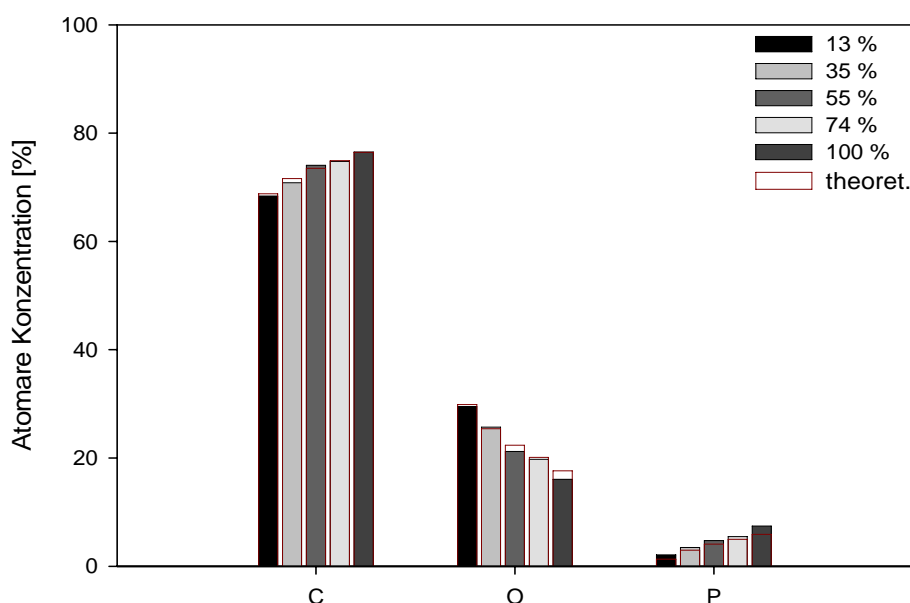


Abbildung 56: Atomare Konzentration der Elemente in Poly-VBP-co-HEMA mit verschiedenen Anteilen an VBP im Vergleich zum theoretischen Wert

Die Konzentration der jeweiligen Elemente stimmt recht gut mit den an Hand der Copolymerzusammensetzung berechneten theoretischen Werten überein. Selbst für Kohlenstoff, dessen Anteil normalerweise durch Verunreinigungen auf der Titanoberfläche erhöht wird, betragen die Abweichungen nur maximal 1 %. Eine geringfügig größere Abweichung von maximal 1,6 % tritt bei den Sauerstoff-Konzentrationen auf, bei denen entgegen der Erwartung die gemessene Konzentration zu gering ist. Der gemessene Anteil an Phosphor hingegen übersteigt bei allen Copolymerzusammensetzungen den theoretischen Wert. Insgesamt liegen die Abweichungen jedoch im Rahmen der Messungenauigkeit der Methode. Während sowohl Kohlenstoff als auch Sauerstoff in beiden Comonomeren vertreten

sind, ist Phosphor nur im VBP enthalten, so dass dessen Konzentration sehr deutlich die Anteile an VBP im Copolymer widerspiegelt. Wie erwartet, steigt daher die Konzentration von Phosphor mit wachsendem Anteil von VBP im Copolymer und erreicht den Maximalwert im Homopolymer von Vinylbenzylphosphonat.

Die hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren in Abbildung 57 bestätigen ebenfalls die Änderung der Zusammensetzung in der angegebenen Tendenz. Der Peak bei 285 eV (C_1) entspricht den aliphatischen und aromatischen Kohlenstoffen und bei einer Verschiebung von 286,5 eV (C_2) befinden sich die einfach an Sauerstoff gebundenen Kohlenstoffe. Der Carbonylsauerstoff besitzt eine Verschiebung von 289 eV (C_3) und auf Grund seines alleinigen Vorhandenseins im HEMA-Comonomer kann an Hand dieses Peaks sehr gut die Veränderung der Zusammensetzung der Copolymere verfolgt werden. Im reinen Poly-VBP ist an dieser Stelle kein Peak sichtbar, mit sinkendem Anteil an VBP und damit steigendem Anteil an HEMA wächst dieser Peak jedoch und ist bei 13 % VBP deutlich als spezifisches Signal zu erkennen. Des Weiteren sinkt mit sinkendem Anteil an VBP auch der Anteil an C_1 -Kohlenstoff, während der Anteil an C_2 steigt, so dass sich die Konzentrationen annähern und die ausgeprägte Schulter, die bei Poly-VBP zu beobachten ist, verschwindet.

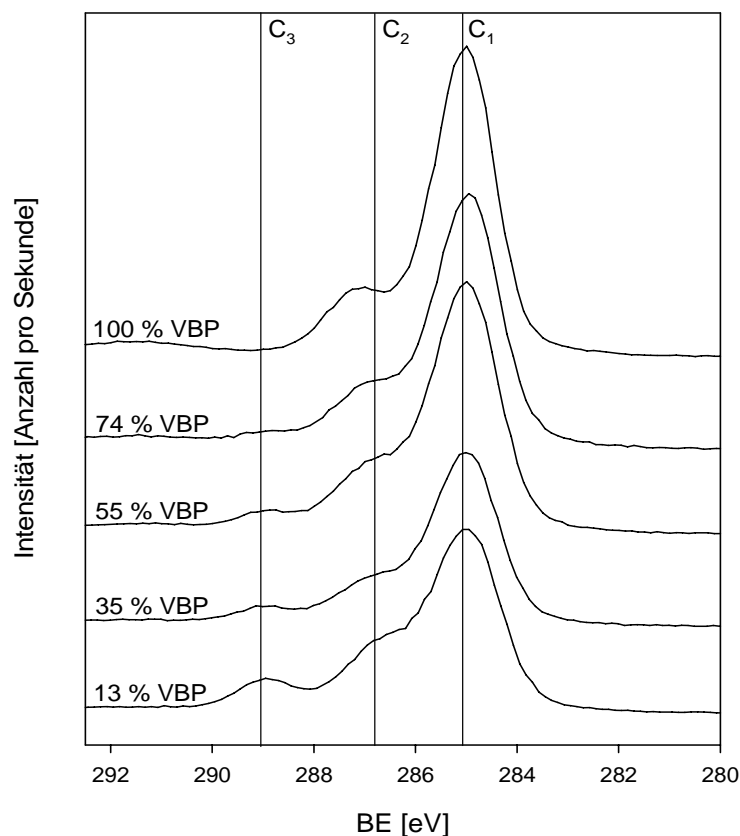


Abbildung 57: Hochaufgelöstes Kohlenstoff-Spektrum von Poly-VBP-co-HEMA mit verschiedenen Anteilen an VBP

Die Umsetzung mit dem CDI kann sowohl über das Vorhandensein von Stickstoff als auch über die Veränderung der Bindungsenergien des Kohlenstoffs verfolgt werden. Die in Abbildung 58 dargestellten hochaufgelösten Spektren von Poly-VBP-co-HEMA sowie dem mit CDI behandelten Copolymer zeigen deutlich die Entstehung eines neuen Peaks bei 290,3 eV, der dem Carbamat-Kohlenstoff (vgl. Abbildung 55) zugeordnet werden kann.^[233]

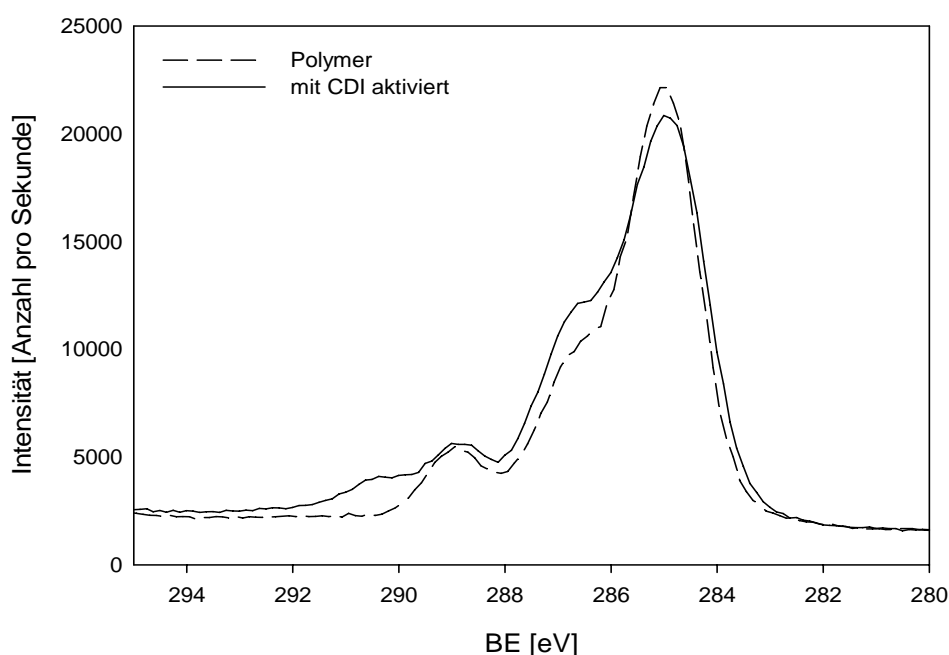


Abbildung 58: Hochaufgelöstes Kohlenstoff-Spektrum von Poly-VBP-co-HEMA mit 13 % VBP als Polymer und mit CDI behandelt

Die Übersichtsscans der mit CDI behandelten Copolymere zeigen, dass sich deutliche Mengen an Stickstoff auf den jeweiligen Oberflächen befinden (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Atomare Konzentrationen für Poly-VBP-co-HEMA als unbehandeltes und mit CDI umgesetztes Copolymer

	<i>13 % VBP</i>	<i>13 % VBP mit CDI</i>	<i>55 % VBP</i>	<i>55 % VBP mit CDI</i>
C	68,38	67,74	74,05	71,70
O	29,50	23,48	21,22	19,63
P	2,12	1,62	4,74	3,85
N		7,16		4,83

Das hochaufgelöste Stickstoff-Spektrum in Abbildung 59 bestätigt, dass es sich dabei um den Stickstoff aus dem Imidazol handelt. Das Spektrum besitzt die Form eines Doublets, da die

beiden Stickstoff-Atome in annähernd gleicher Konzentration vorhanden sind, aber eine unterschiedliche molekulare Umgebung besitzen, die eine Differenz von ungefähr zwei in der Bindungsenergie erzeugt.^[173, 234] Der an die Carbonylgruppe gebundene Stickstoff mit der Umgebung eines Amins wird der höheren Bindungsenergie von 401,7 eV zugeordnet, der andere in Imin-Umgebung einer Bindungsenergie von 399,7 eV.^[173, 235] Diese Ergebnisse entsprechen denjenigen, die BÖCKING bei der Aktivierung von Tetra(ethylenoxid) terminierten Si-C-Monoschichten^[173] und MARTIN bei der Umsetzung von Poly-HEMA^[234] mit CDI erhalten haben.

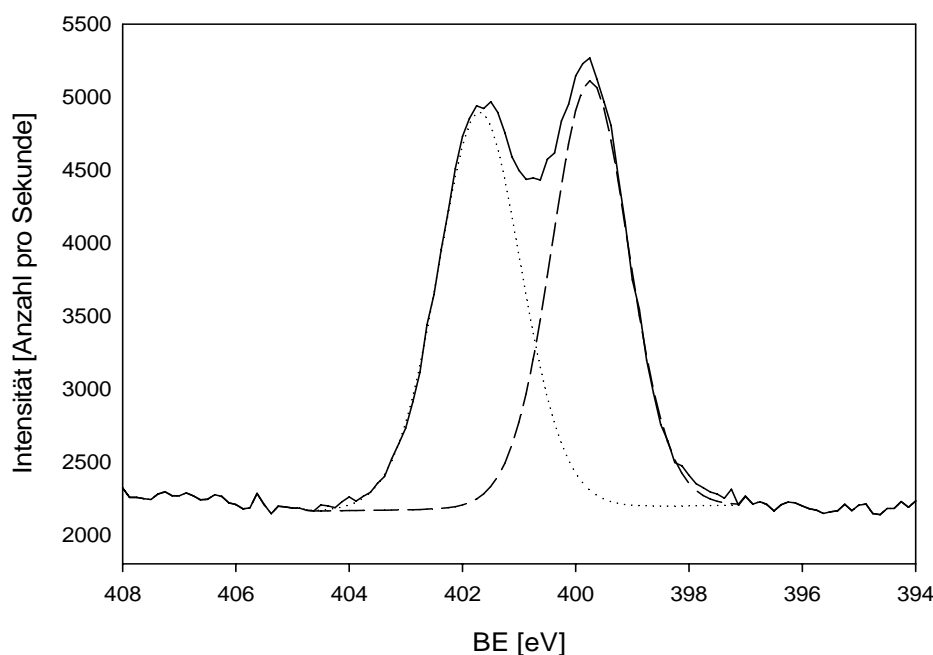


Abbildung 59: Hochauflöstes Stickstoff-Spektrum von Poly-VBP-co-HEMA (13% VBP) mit CDI behandelt

Der Grad der Aktivierung kann ebenfalls über die Konzentration an Stickstoff und den erreichten Anteil an Carbamat-Kohlenstoff berechnet werden. Die in Tabelle 8 aufgelisteten Ausbeuten zeigen eine höhere Ausbeute bei der Berechnung über die Stickstoff-Konzentration. Da jedoch trotz eines Waschvorgangs nicht davon ausgegangen werden kann, dass sämtlicher Stickstoff auf der Oberfläche in Form eines kovalent gebundenen Imidazols vorliegt, bietet die Berechnung über den Carbamat-Kohlenstoff-Anteil eine realistischere Einschätzung des Umsatzes.

Tabelle 8: Ausbeuten bei der Aktivierung mit CDI

<i>Anteil VBP</i>	<i>Ausbeute berechnet über die Stickstoff- Konzentration</i>	<i>Ausbeute berechnet über den Carbamat- Kohlenstoff-Anteil</i>
13 %	66 %	59 %
55 %	89 %	60 %

Neben den hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren können außerdem die Spektren des Sauerstoffs betrachtet werden. Bei der Umsetzung mit CDI kommt durch das Carbamat ein weiterer Sauerstoff hinzu, so dass eine deutliche Veränderung der Anteile zu erwarten wäre. Die Sauerstoffe im unbehandelten beziehungsweise mit CDI umgesetzten Film können theoretisch wie folgt eingeteilt werden: O₁ entspricht dem doppelt an Phosphor gebundenen Sauerstoff mit einer Verschiebung von 531,5 eV, O₂ spiegelt die einfach an Phosphor gebundenen, den Sauerstoff der Hydroxygruppe, den der Carbonylgruppe des Methacrylats und den Carbamat-Sauerstoff wider und O₃ die neben der Carbonyl/Carbamatgruppe liegenden Sauerstoffe. In Abbildung 60 ist das hochaufgelöste Sauerstoff-Spektrum eines Copolymerfilms mit 13 % VBP dargestellt. Die Auswertung erweist sich als schwierig, da neben dem Sauerstoff aus dem Titanoxid mit einer Bindungsenergie von 530 eV nur noch ein weiterer großer Peak sichtbar ist. Anhand der berechneten Erwartungswerte wurde daher ein Fit vorgenommen, der den Peak in drei weitere mit den entsprechenden Bindungsenergien unterteilt. Diese sind in Abbildung 60 eingetragen.

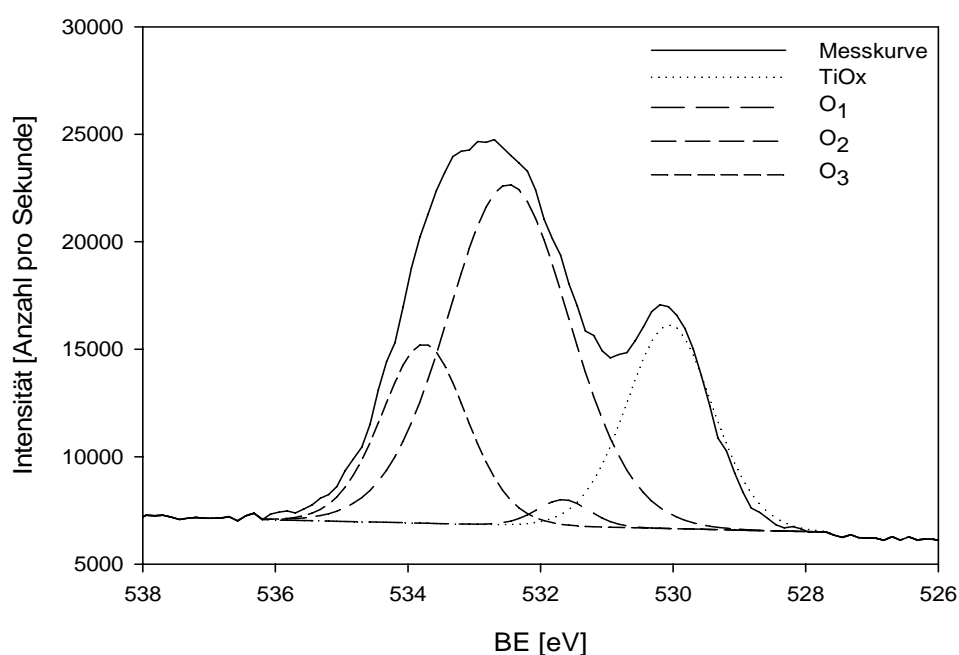
**Abbildung 60: Hochaufgelöstes Sauerstoff-Spektrum des Copolymerfilms mit 13 % VBP**

Abbildung 61 zeigt exemplarisch die Anteile der Sauerstoffe für den unbehandelten Copolymerfilm sowie den mit CDI umgesetzten Film mit einem Anteil von 13 % VBP. In Abschnitt A sind die Messwerte des unbehandelten Films dargestellt, die sehr gut mit den Erwartungswerten übereinstimmen. Abschnitt B zeigt die Messwerte des Films, der mit CDI umgesetzt wurde. Anhand der eingetragenen theoretischen Werte sowohl für den unbehandelten als auch den vollständig mit CDI umgesetzten Film ist sehr gut die Veränderung der Anteile bei einer Reaktion zu erkennen. Diese Veränderung wird auch aus den Messwerten deutlich, die Anteile der Sauerstoffe O₂ und O₃ haben sich angeglichen und stimmen recht gut mit den Erwartungswerten für einen mit CDI umgesetzten Film überein.

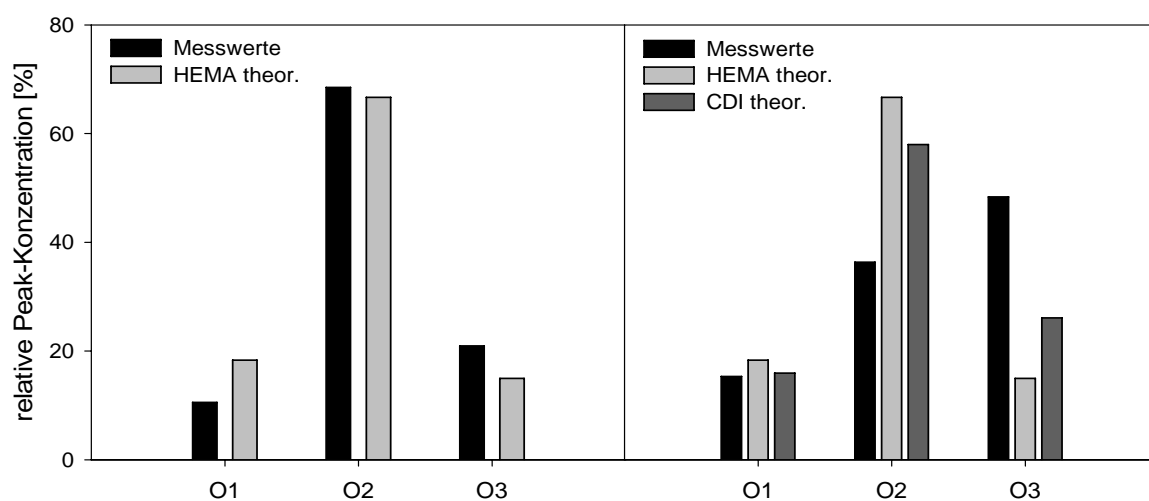


Abbildung 61: Anteile der Sauerstoffe aus den hochaufgelösten Sauerstoff-Spektren des Copolymerfilms mit 13 % VBP

Für die Filme mit 55 % VBP konnte keine so gute Übereinstimmung gefunden werden, die entsprechenden Abbildungen befinden sich im Anhang. Wie oben bereits erwähnt ist die Auswertung auf Grund der Form des Spektrums schwierig, so dass die Aussagekraft eher gering eingeschätzt wird. Zur Überprüfung der Reaktion mit CDI werden daher hauptsächlich die hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren berücksichtigt, welche eine signifikante Änderung durch die Addition des Carbamat-Kohlenstoffs erfahren.

8.2.3 Anbindung von BMP

Die Untersuchungen der mit CDI behandelten Filme aus Poly-VBP-co-HEMA haben ergeben, dass nur 60 % der Hydroxygruppen mit CDI reagiert haben. Da es sich nicht um eine selbstorganisierende Monoschicht handelt, bei der alle Kopfgruppen nach oben orientiert sind, sondern es auch Einschränkungen in der Zugänglichkeit gibt, ist dies nicht weiter verwunderlich. Daher wurden für dieses Copolymer ein ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)^[105] sowie ein BREluc-Test^[236] durchgeführt, um die angebundene und

biologisch aktive Menge an BMP2 zu quantifizieren. Für den ELISA-Test werden mit Polymer beschichtete und unbeschichtete Plättchen als Kontrolle mit BMP2 inkubiert. Ein hinzugegebener Maus-Antikörper für BMP2 reagiert mit dem BMP2, ein Peroxidase-Konjugat eines Antikörpers aus der Ziege für den Maus-Anti-BMP2-Antikörper wiederum mit diesem. Mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin erfolgt eine Farbreaktion und die dabei in einer bestimmten Zeit freigesetzte Farbstoffmenge wird über die Messung der Adsorption bestimmt. Mit Hilfe einer vorher durchgeführten Kalibration kann daraus die Menge des gebundenen BMPs bestimmt werden. Während beim ELISA-Test die immunologisch aktive Menge BMP2 bestimmt wird, ist der BRELUC-Test geeignet, die biologisch aktive Menge an BMP2 zu bestimmen. Dazu werden C2C12-Zellen, die auf BMP2 mit der Expression von Luciferase reagieren, auf den Plättchen ausgesät und nach 24 Stunden über die enzymatische Aktivität der synthetisierten Luciferase die Menge an BMP2 bestimmt. Die Resultate in Abbildung 62 zeigen, dass bei dem ELISA-Test eine deutlich größere Menge (114 ± 20 ng/cm²) an gebundenem BMP2 bestimmt wird als dann laut BRELUC-Test biologisch aktiv sind (11 ± 2 ng/cm²). Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Teil des BMP2 durch die kovalente Anbindung seine Wirksamkeit verliert. Weiterhin besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Differenz in der nachgewiesenen Menge auf die unzureichende Zugänglichkeit des BMP2 für die im BRELUC-Test eingesetzten Zellen zurückzuführen ist, wohingegen es für die beweglicheren Antikörper im ELISA gut zu erreichen ist.

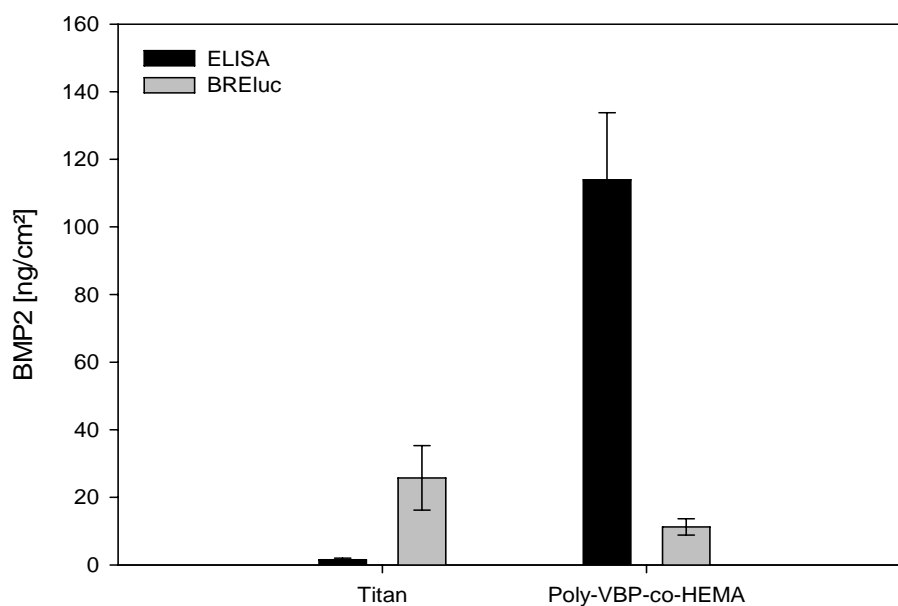


Abbildung 62: BMP2 auf Poly-VBP-co-HEMA (13 % VBP, Schichtdicke mit CDI $7,9 \pm 3$ nm) bestimmt durch ELISA und BRELUC

Außerdem tritt während des BRELUC das Problem einer starken Adsorption von BMP2 an das unbehandelte Titan auf, die im ELISA aber nicht beobachtet werden konnte. Da während der Beschichtung alle Plättchen gleich behandelt werden und folglich mögliche organische Verunreinigungen, mit denen das BMP2 reagieren kann, auf allen Plättchen zu finden sein müssten, scheint der Polierprozess der einzige Vorgang zu sein, der die Plättchen unterschiedlich beeinflussen kann. CHATZINIKOLAIDOU et al. konnten beispielweise zeigen, dass die unspezifische Adsorption von BMP2 auf Titan sehr stark von der Behandlung der Oberfläche abhängig ist.^[65] Während auf elektropolierten Titansubstraten die Adsorption von $29 \pm 4 \text{ ng/cm}^2$ BMP2 nachgewiesen wurde, konnte durch eine Behandlung mit Chromschwefelsäure die unspezifische Adsorption auf $2 \pm 2 \text{ ng/cm}^2$ reduziert werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Beschichtungen und Untersuchungen werden die Substrate manuell mechanisch poliert. Um ein bei optischer Betrachtung optimales Ergebnis zu erhalten, werden dabei nicht alle Plättchen gleich lang poliert, so dass die messbare Rauigkeit der Plättchen variieren kann. Auf diesem Weg wäre es möglich, dass die Plättchen, die im BRELUC-Test eingesetzt wurden, zu einer stärkeren unspezifischen Adsorption neigen als andere Plättchen.

8.3 Poly(dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat)

8.3.1 Charakterisierung der Schichten

Auch bei Poly-DMMEP-co-HEMA zeigt sich beim Beschichten im spin-coating-Verfahren die Ausbildung einer optisch sichtbaren Struktur, daher wurde zur Herstellung der Filme ebenfalls das oben beschriebene Tauchverfahren angewendet. Basierend auf den Ergebnissen mit Poly-VBP-co-HEMA wurde auch hier eine Tauchlösung mit einer Konzentration des Copolymers von $0,3 \text{ mg/mL}$ eingesetzt. Anhand der Darstellung der Schichtdicken in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Copolymers in Abbildung 63 wird jedoch ersichtlich, dass mit dieser Methode keine so gleichmäßigen und reproduzierbaren Schichten wie bei Poly-VBP-co-HEMA erhalten werden können. Die Schichtdicken zeigen keine Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Copolymers und auch beim Vergleich der unterschiedlichen Messreihen ist keine einheitliche Tendenz zu beobachten. Des Weiteren beträgt die Standardabweichung durchschnittlich $2\text{-}3 \text{ nm}$, was für eine sehr inhomogene Schicht spricht.

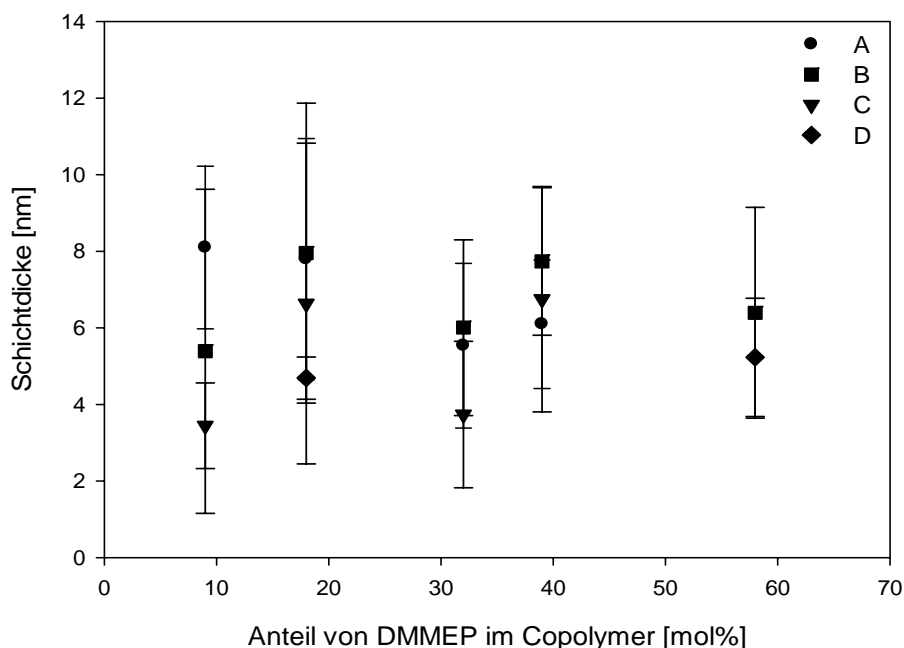


Abbildung 63: Abhängigkeit der Schichtdicke von der Zusammensetzung des Copolymers, Konzentration der Tauchlösung 0,3 mg/mL

Die Kontaktwinkel der in Abbildung 63 aufgetragenen Messreihen A und B sind in Abbildung 64 gezeigt. Werden alle Werte betrachtet, ist keine Abhängigkeit des Kontaktwinkels von der Zusammensetzung des Copolymers beobachtbar. Es fällt jedoch auf, dass die Winkel von Reihe A um 2-3° niedriger liegen als die von Reihe B, jedoch noch innerhalb der Standardabweichung des jeweils anderen. Neben den der Methode eigenen Messungenauigkeiten könnte auch die Lagerungszeit zwischen der Herstellung und der Durchführung der Messungen dafür verantwortlich sein. Da die Proben aus Reihe A vor der Messung längere Zeit gelagert wurden, könnten die Filme Wasser aus der Luftfeuchtigkeit aufgenommen haben und somit ihre Hydrophilie verändert haben. Die Hysterese innerhalb der Messreihen beträgt 3-4°, so dass anzunehmen ist, dass sich ein recht homogener Film ausgebildet hat. Dies steht im Widerspruch zu den Schlussfolgerungen bei der Bestimmung der Schichtdicke, jedoch konnte die Ursache hierfür bisher nicht geklärt werden.

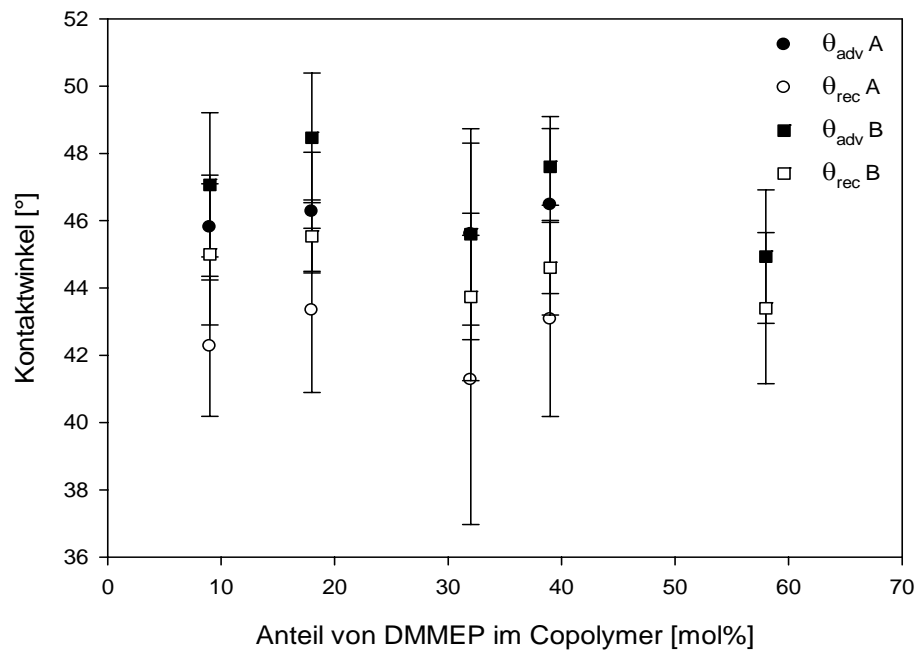


Abbildung 64: Kontaktwinkel in Abhängigkeit der Zusammensetzung des Copolymers

Die Filme aus Poly-DMMEP-co-HEMA wurden außerdem stichprobenartig mittels REM untersucht. Abbildung 65 zeigt die REM-Aufnahmen von zwei Filmen mit unterschiedlichen Anteilen an DMMEP und unterschiedlichen Schichtdicken. Das Bild A wurde von einem Film mit einer Schichtdicke von $4,2 \pm 1,8$ nm aufgenommen, die dort sichtbaren Streifen sind höchstwahrscheinlich beim Polieren des Titansubstrates entstanden. Da die Schichtdicke nur wenige Nanometer beträgt, wird die Oberflächenstruktur des Titans widergegeben und nicht überdeckt. B hingegen zeigt die Aufnahme eines etwas dickeren Films bei gleicher Vergrößerung ohne die beschriebenen Streifen. Da es eher unwahrscheinlich ist, dass der Film diese Struktur durch eine Verdoppelung der Schichtdicke auf etwa 8 nm schon überdeckt, handelt es sich vermutlich um ein besser poliertes Substrat, welches nicht die beobachteten Riefen aufweist. In diesem Fall ist jedoch eine leichte Strukturierung des Films zu beobachten. Das Plättchen ist gleichmäßig, jedoch nicht vollständig mit Polymer bedeckt, welches eine Art Kruste auf der Oberfläche ausgebildet zu haben scheint. Um mit der Tauchmethode zukünftig eine homogene Beschichtung zu erzielen, erscheint eine weitere Variation der Parameter wie beispielsweise Beschichtungszeit und Konzentration der Lösungen sinnvoll.

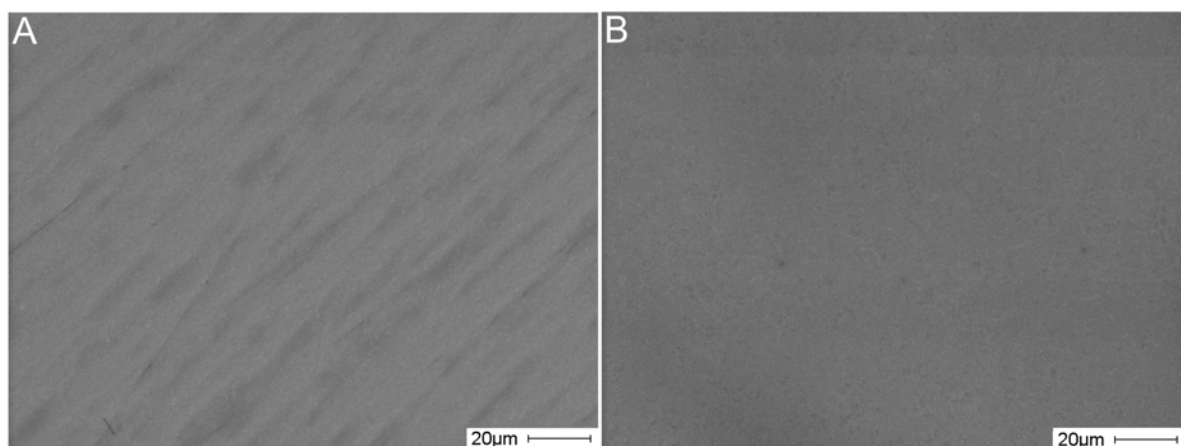


Abbildung 65: REM-Aufnahmen von Filmen aus Poly-DMMEP-co-HEMA. A: 32 % DMMEP, $4,2 \pm 1,8$ nm; B: 9 % DMMEP, $8,6 \pm 1,3$ nm

8.3.2 Aktivierung

Ebenso wie die Polymerfilme aus Poly-VBP-co-HEMA müssen die Filme aus Poly-DMMEP-co-HEMA zur Anbindung des Proteins zunächst mit CDI aktiviert werden. Die anschließende Charakterisierung erfolgt in diesem Fall nur über XPS. In Abbildung 66 findet sich eine Darstellung der atomaren Konzentrationen von Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor, die aus Übersichtsscans von Filmen mit 18 % und 58 % DMMEP erhalten wurden. Die aus der Copolymerzusammensetzung berechneten Erwartungswerte sind ebenfalls aufgetragen und es zeigt sich sowohl bei Kohlenstoff als auch bei Sauerstoff eine deutliche Abweichung der Messwerte von den Erwartungswerten.

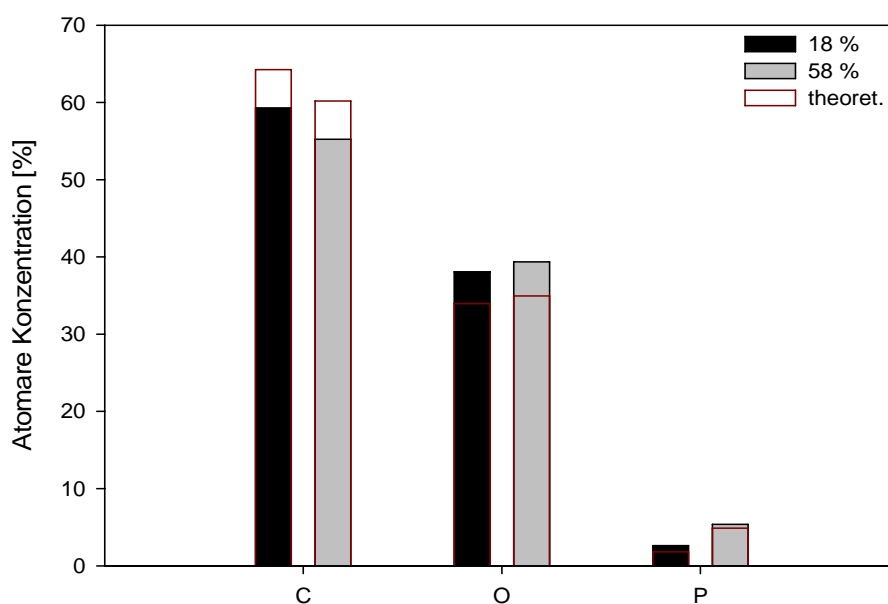


Abbildung 66: Atomare Zusammensetzung von Filmen aus Poly-DMMEP-co-HEMA mit 18 und 58 % DMMEP im Vergleich mit den theoretischen Erwartungswerten

Üblicherweise befinden sich auf den Substraten Verunreinigungen von Kohlenwasserstoffen,^[237] die zu einem erhöhten Wert für Kohlenstoff führen, daher konnte bisher noch keine Erklärung gefunden werden, warum die gemessene Konzentration unter den theoretisch berechneten Werten liegt. Da es sich aber um Abweichungen von etwa 5 % handelt, befinden sie sich durchaus noch im Rahmen der Messungenauigkeit, so dass erst die Aufnahme von weiteren Messwerten Aufschluss über diesen Zusammenhang liefern kann. Ähnliches gilt für die Sauerstoff-Konzentration, bei der der gemessene Wert um etwa 5 % größer ist als der theoretisch berechnete. Die Konzentration von Phosphor stimmt recht gut mit den theoretisch ermittelten Werten überein und spiegelt somit sehr deutlich die unterschiedlichen Anteile an Phosphor in den Polymerfilmen wider.

Die atomaren Konzentrationen von Kohlenstoff und Sauerstoff in den mit CDI behandelten Polymerfilmen zeigen eine deutlich bessere Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Werten (vgl. Abbildung 67). Abweichungen von etwa 5 % treten in diesem Fall bei der Konzentration von Phosphor auf, jedoch steigt auch hier die Konzentration von Phosphor mit steigendem Anteil an DMMEP im Copolymer. Wie auch bei den mit CDI umgesetzten Filmen aus Poly-VBP-co-HEMA ist die Stickstoff-Konzentration deutlich geringer als die theoretisch berechnete und zeigt somit, dass keine vollständige Umsetzung stattgefunden hat. Der aus der Stickstoffkonzentration berechnete Grad der Umsetzung beträgt für den Copolymerfilm mit 18 % DMMEP 57 % und für den Film mit 58 % DMMEP 35 %.

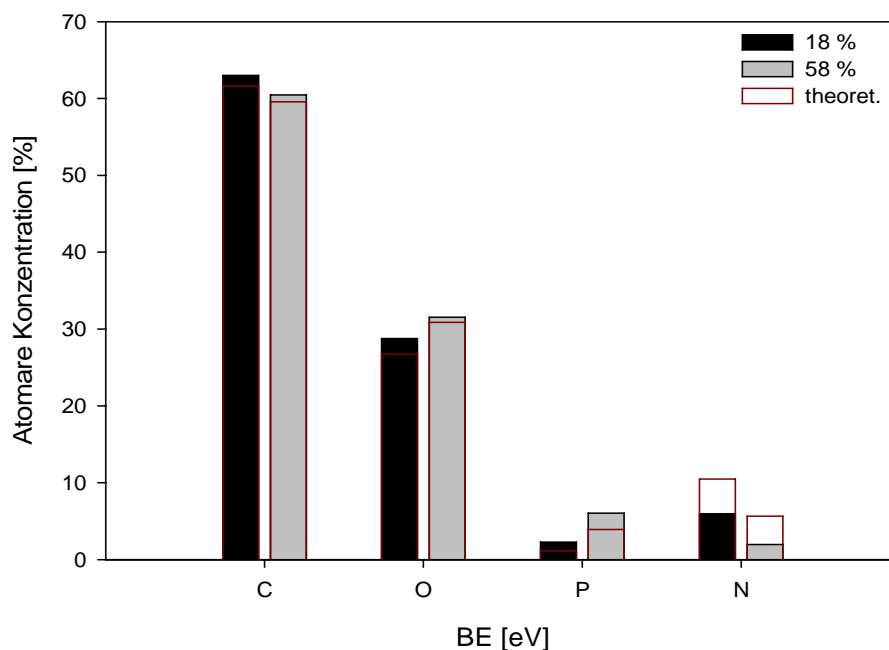


Abbildung 67: Atomare Zusammensetzung von Schichten aus Poly-DMMEP-co-HEMA mit verschiedenen Anteilen an DMMEP

Der Grad der Umsetzung lässt sich jedoch auch in diesem Fall über die Konzentration des neu entstandenen Carbat-Kohlenstoffs berechnen. Abbildung 68 zeigt das hochaufgelöste Kohlenstoff-Spektrum des Polymerfilms mit 18 % DMMEP sowie das Spektrum des mit CDI umgesetzten Films und die dort hineingelegten Peaks für die verschiedenen Kohlenstoffe. C₁ (285 eV) enthält die Kohlenstoffe des Rückgrats, C₂ mit einem Maximum bei 286,5 eV die einfach an Sauerstoff und Phosphor gebundenen Kohlenstoffe und C₃ bei 288,7 eV die Carbonylkohlenstoffe. Der mit C₄ bezeichnete Kohlenstoff bei 290,1 eV schließlich entspricht dem Carbat-Kohlenstoff, der bei der Umsetzung mit CDI entsteht, wie aus dem Vergleich mit dem Spektrum des unbehandelten Polymerfilms gut ersichtlich ist. Der daraus berechnete Grad der Umsetzung beträgt für den Film mit 18 % DMMEP 48 % und für den Film mit 58 % DMMEP nur 14 %. Diese Werte sind deutlich geringer als die Ausbeuten, die aus der Stickstoff-Konzentration berechnet werden können. Da jedoch die Stickstoff-Konzentration durch Verunreinigungen und nicht durch Waschen entferntes ungebundenes CDI oder Imidazol beeinflusst wird, dient auch in diesem Fall das Kohlenstoff-Signal einer realistischeren Einschätzung.

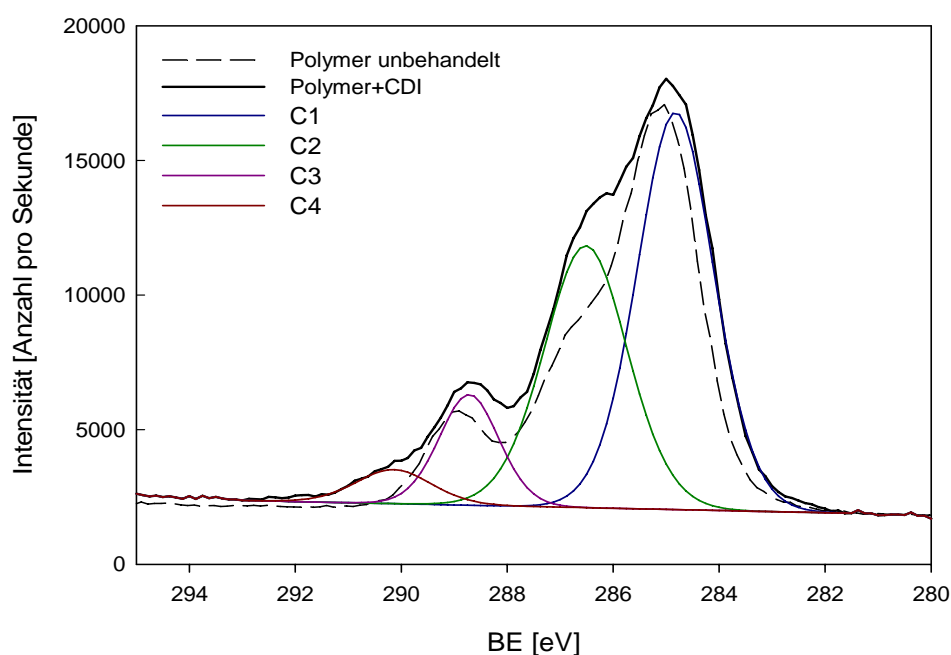


Abbildung 68: Hochaufgelöstes Kohlenstoff-Spektrum eines unbehandelten und eines mit CDI umgesetzten Films aus Poly-DMMEP-co-HEMA mit 18 % DMMEP

Abbildung 69 zeigt das hochaufgelöste Signal des Stickstoffs. Analog zur Literatur^[238, 239] und dem bereits bei Poly-VBP-co-HEMA beobachteten Signal erscheint hier ebenfalls der für den Imidazolring charakteristische Doppelpeak. In diesem Fall sind die Anteile jedoch leicht gegeneinander verschoben, der Peak bei 400 eV hat einen Anteil von 53 %, der bei 402 eV einen von 47 %.

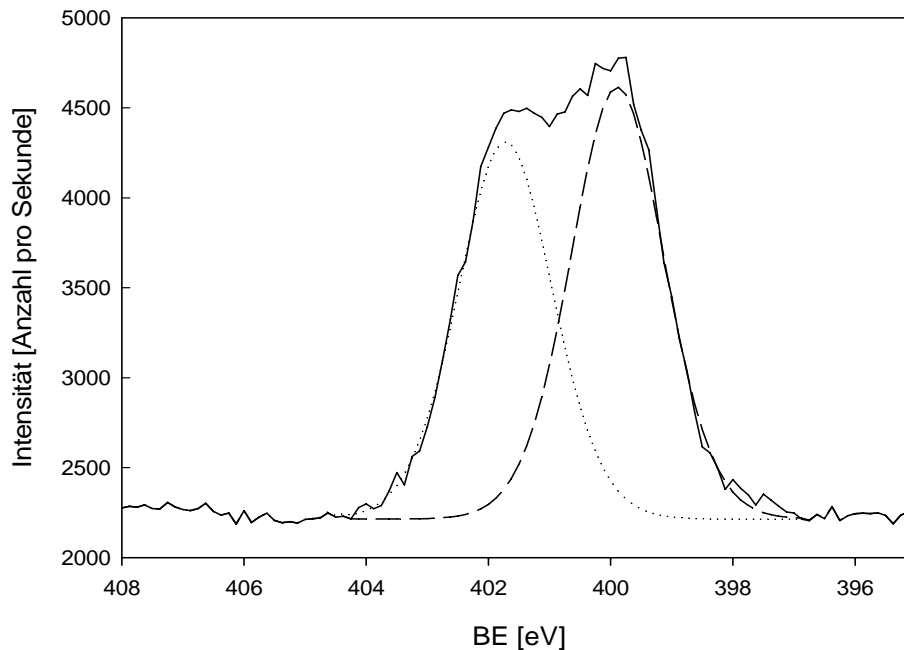


Abbildung 69: Hochaufgelöstes Stickstoff-Spektrum von mit CDI umgesetztem Poly-DMMEP-co-HEMA mit 18 % DMMEP

Zur Überprüfung der Umsetzung mit CDI können ebenfalls die hochaufgelösten Spektren des Sauerstoffs herangezogen werden, da bei der Reaktion der Sauerstoff der Carbamat-Gruppe hinzugefügt wird, so dass sich die Verhältnisse der Sauerstoffe untereinander ändern sollten. Analog zu den Untersuchungen an Poly-VBP-co-HEMA werden die Sauerstoffe wie folgt eingeteilt: O_1 entspricht dem doppelt gebundenen Sauerstoff der Phosphonatgruppe mit einer Bindungsenergie von 531,5 eV, O_2 den Carbonylsauerstoffen aus der Methacrylatfunktion und der Carbamatgruppe sowie den einfach an Phosphor gebundenen Sauerstoffen und dem der Hydroxyfunktion (BE ca. 532 eV) und O_3 dem Ester-Sauerstoff der Methacrylatfunktion (BE= 533,6 eV). Auch hier erweist sich die Auswertung als schwierig, da die genannten Sauerstoffe O_1 bis O_3 nur als ein großer Peak sichtbar sind und die entsprechenden Anteile mit Hilfe eines Fits ermittelt werden (vgl. Abbildung 70).

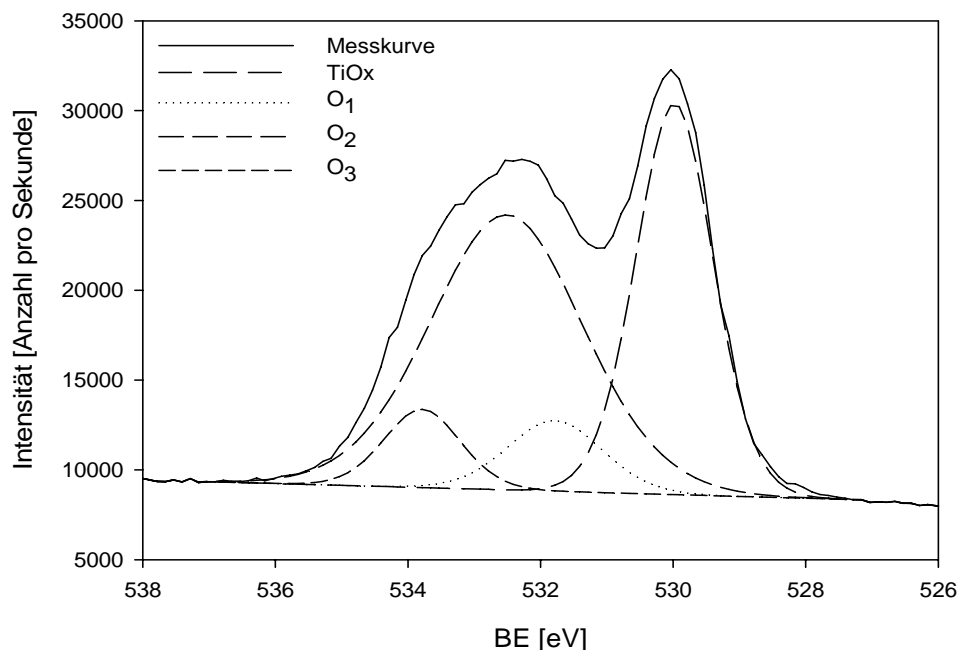


Abbildung 70: Hochaufgelöstes Sauerstoff-Spektrum des unbehandelten Copolymerfilms mit 18 % DMMEP

Abbildung 71 zeigt die Anteile der jeweiligen Sauerstoffe in den unbehandelten Filmen der Copolymere mit 18 % und 58 % DMMEP sowie die der mit CDI behandelten Filme. Bereits die Spektren der unbehandelten Filme zeigen keine gute Übereinstimmung mit den Erwartungswerten, welches aber auch auf die Durchführung des Fits zurückgeführt werden kann. Der mit CDI umgesetzte Film des Copolymers mit 18 % DMMEP entspricht hingegen viel besser den berechneten Werten für einen HEMA-haltigen Film. Von der Tendenz passen die Anteile des mit CDI umgesetzten Films des Copolymers mit 58 % DMMEP besser zu den Erwartungswerten für den reagierten Film. Jedoch widersprechen diese Ergebnisse denen, die aus der Auswertung der hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren und des Anteils an Stickstoff ermittelt wurden, welche einen höheren Grad der Umsetzung für den Film mit 18 % DMMEP ergeben. Da die Auswertung der Sauerstoff-Spektren auf Grund des großen Peaks sehr stark von der Wahl der Fits abhängig ist, wird diesen nur eine geringe Aussagekraft zugeschrieben. Rückschlüsse auf die Umsetzung des Copolymers mit CDI werden daher aus den hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren gezogen, welche zeigen, dass die Umsetzung des Films mit 18 % DMMEP in größerem Ausmaß stattgefunden hat als die des Films mit 58 % DMMEP, wobei jedoch noch eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Erhöhung der Ausbeute erfolgen kann.

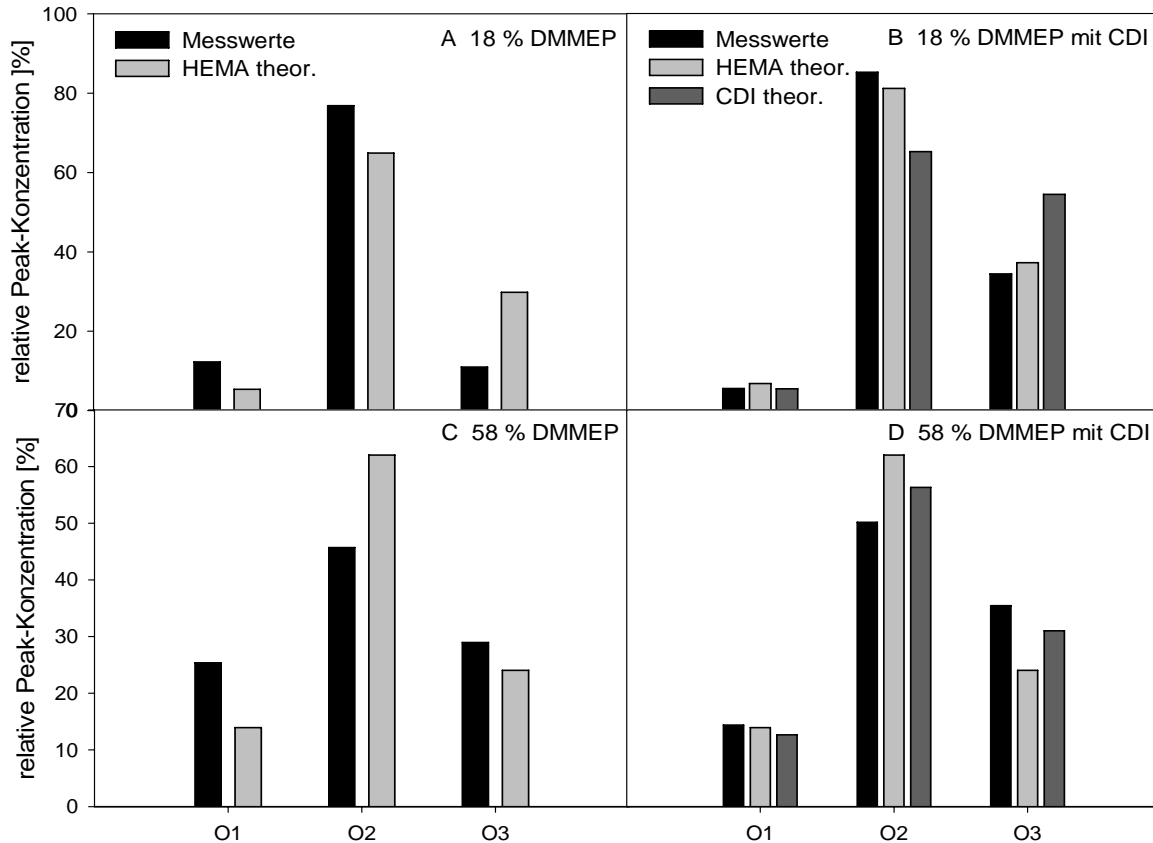


Abbildung 71: Anteile der Sauerstoffe aus den hochaufgelösten Spektren der unbehandelten Copolymerfilme mit 18 und 58 % DMMEP sowie den mit CDI behandelten

8.4 Vergleich

Durch den Austausch des Vinylbenzylphosphonats gegen Dimethyl-(2-methacryloyloxyethyl)-phosphonat kann der Einfluss des phosphonattragenden Monomers auf die Ausbildung der Schichten sowie die Auswirkungen der Hydrophilie der Schicht untersucht werden. Werden die Copolymere mit einem spin-coating-Verfahren auf die Titanplättchen aufgebracht, zeigt sich bei beiden eine bereits mit bloßem Auge sichtbare Struktur. Daher wurden nach Versuchen zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration Lösungen von 0,3 mg/mL des Copolymers für die Beschichtung in einem Tauchverfahren eingesetzt. Dabei zeigte sich bei Poly-VBP-co-HEMA im Mittel eine Schichtdicke von 7 ± 1 nm, die unabhängig von der Zusammensetzung des Copolymers ist. Die Filme aus Poly-DMMEP-co-HEMA hingegen zeigen hinsichtlich der Schichtdicke keine sehr gute Reproduzierbarkeit, zwischen den einzelnen Messreihen schwanken die Schichtdicken teilweise um bis zu 5 nm und auch die Standardabweichungen betragen bis zu 4 nm. Ein deutlicher Einfluss des hydrophilen DMMEPs ist bei den Kontaktwinkeln zu erkennen. Die fortschreitenden Kontaktwinkel von Poly-VBP-co-HEMA bewegen sich im Bereich von 56°

bis 60° mit Abweichungen von bis zu 3°, die von Poly-DMMEP-co-HEMA hingegen zwischen 45° und $48 \pm 3^\circ$. Bei der Umsetzung mit CDI werden für Poly-VBP-co-HEMA jeweils höhere Ausbeuten erreicht, dies ist besonders deutlich bei Copolymeren mit höheren Anteilen an Phosphonat erkennbar. Bei 55 % VBP wird eine Ausbeute von 60 % erreicht, bei einem Anteil von 58 % DMMEP lediglich nur 14 %. Ein höherer Grad der Umsetzung bei der Aktivierung kann bei geringeren Anteilen des Phosphonats erzielt werden. Die Hydroxygruppen im Copolymerfilm mit einem Anteil von 18 % DMMEP können zu 49 % umgesetzt werden, diejenigen im Film mit einem VBP-Anteil von 13 % zu 59 %.

Zusätzlich konnte von PFAFFENROTH et al. gezeigt werden, dass nicht nur wie bereits aus Arbeiten von ADDEN bekannt, das Homopolymer von DMMEP negative Auswirkungen auf die Adhäsion und das Wachstum von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hat,^[193] sondern auch Copolymere mit hohen Anteilen an DMMEP die Proliferation von humanen Gingivafibroblasten deutlich verringern.^[240] Zusammengefasst bilden die Copolymere aus VBP und HEMA somit homogenere und reproduzierbarere Filme aus, zeigen deutlich bessere Ergebnisse in der Aktivierung und besitzen vermutlich eine bessere Biokompatibilität im Vergleich zu den Filmen aus Poly-DMMEP-co-HEMA. Daher wurde die Anbindung des BMP2 nur auf einem Film aus Poly-VBP-co-HEMA durchgeführt. Die dabei erhaltenen Resultate zeigen, dass mit Hilfe eines CDI-aktivierten Films $114 \pm 20 \text{ ng/cm}^2$ BMP2 angebunden werden können, von denen jedoch nur etwa 10 % biologisch aktiv sind.

9 Poly(vinylbenzylphosphonat-co-glycidylmethacrylat)

Auf Grund der vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten mit zum Beispiel Aminen, Hydroxygruppen oder Thiolen existieren inzwischen mehrere Generationen von epoxidhaltigen Trägern auf dem Markt,^[241] die insbesondere zur Immobilisierung von Proteinen und Enzymen in biotechnologischen Anwendungen eingesetzt werden. Vorangehende Arbeiten konnten außerdem bereits zeigen, dass Copolymere aus VBP und Glycidylmethacrylat in der Lage sind, BMP2 auf Titan zu immobilisieren.^[188] Darauf aufbauend erfolgt in der vorliegenden Arbeit eine weitere Charakterisierung der Filme sowie weitere *in-vitro*- und *in-vivo*-Tests mit dem genannten Copolymersystem.

9.1 Charakterisierung der Polymerschicht

9.1.1 Ellipsometrie

Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden die Filme aus Poly-VBP-co-GMA stets nach dem gleichen Verfahren hergestellt. Da die Experimente jedoch über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurden, gab es Schwankungen in den schwer zu beeinflussenden Laborparametern wie zum Beispiel Temperatur und Luftfeuchtigkeit, welche sich möglicherweise auf die Ausbildung der Schichten ausgewirkt haben. Abbildung 72 zeigt die Schichtdicken in Abhängigkeit der Zusammensetzung für verschiedene Versuchsreihen (A-F).

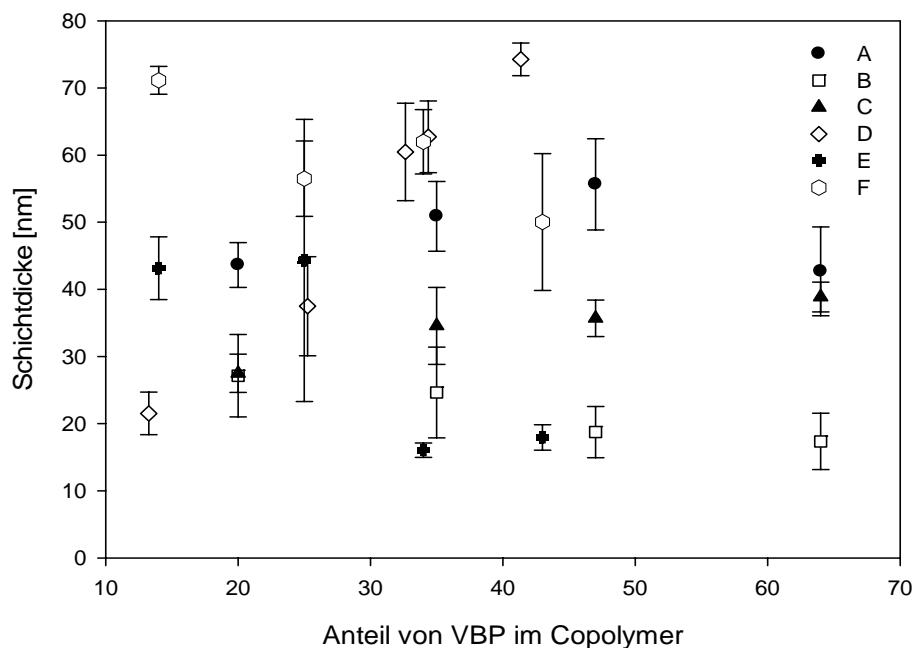


Abbildung 72: Schichtdicke in Abhängigkeit von der Zusammensetzung

Die Schichtdicken, die aus Poly-VBP-co-GMA mittels spin-coating erhalten werden, variieren zwischen 16 und 75 nm und sind somit um ein vielfaches höher, als es für Monoschichten dieses Polymers erwartet wurde. Typische Werte für ein auf Phosphonaten basierendes Copolymersystem, Poly-VBP-co-NASI, liegen beispielsweise im Bereich von 2-8 nm.^[96] Somit ist die mit dem vorliegenden System erhaltene dünnste Schicht von 16 nm bereits doppelt so hoch wie die höchste Schichtdicke, die bei Poly-VBP-co-NASI bestimmt wurde. Die höchsten Schichtdicken, die gemessen wurden, betragen etwa 75 nm und sind damit etwa 10 mal so dick wie die Schichten des bereits bekannten Systems.

ADDEN konnte für Poly-VBP-co-NASI nachweisen, dass die Schichtdicke in starkem Zusammenhang mit der Zusammensetzung des Copolymers steht. In XPS-Untersuchungen beweisen die stärker werdenden Signale für Sauerstoff und Titan bei absteigendem Phosphorgehalt im Copolymer eine Abnahme der Schichtdicke.^[96] Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 72 nur in einigen Experimenten zu erkennen. In Reihe D steigt beispielsweise die Schichtdicke von 21 nm bei einem VBP-Anteil von 13 % weitestgehend linear auf eine Schichtdicke von 74 nm bei 41 %. In Reihe B hingegen ist dieser Trend nicht zu beobachten, die Schichtdicken verhalten sich gegenläufig und sinken von 27 auf 17 nm bei steigendem Anteil an VBP im Copolymer.

Diese Beobachtungen können mit einer partiellen Hydrolyse der Epoxidgruppen und der daraus entstehenden Vernetzung der Polymer-Moleküle erklärt werden. Obwohl trockene Lösungsmittel verwendet werden, kann es durch Spuren von Wasser oder Luftfeuchtigkeit zur

Hydrolyse einzelner Epoxidgruppen kommen. Diese können dann an weiteren Positionen den Epoxidring hydrolytisch öffnen. Eine sowohl bei der Reaktion von GMA mit Dextran als auch 2-[2-Dimethylaminoethyl(methyl)amino]ethanol beobachtete Umesterung^[242, 243] ist ebenfalls möglich. Dabei findet nicht wie erwartet eine Ringöffnung des Epoxids durch die Hydroxygruppe statt, sondern eine Umesterung des Methacrylats unter Freisetzung von Glycidol. REIS et al. konnten hingegen zeigen, dass bei dem Reaktionsweg des Epoxidrings (Ringöffnung oder Umesterung) eine Abhängigkeit des pH-Wertes besteht und das Verhältnis von Umesterung zu Ringöffnung bei der Reaktion mit Poly(vinylalkohol) bei pH 10,5 etwa 1:7 beträgt. Bei geringen pH-Werten findet ausschließlich die Ringöffnung statt.^[244] Diese und vermutlich noch weitere ablaufende Nebenreaktionen führen zur Verknüpfung der Polymerknäule untereinander. Ohne eine Vernetzung binden einzelne Knäule mit ihren Phosphonatgruppen an die Titanoberfläche, während darüber liegendes Polymer ohne Kontakt zur Oberfläche durch Waschen entfernt wird, so dass eine Monoschicht entsteht. Sind die Polymerknäule durch die Vernetzung aber auch untereinander verknüpft, können sie nicht durch Waschen entfernt werden, so dass deutlich dickere Schichten erhalten werden. Dieses ist schematisch in Abbildung 73 dargestellt.

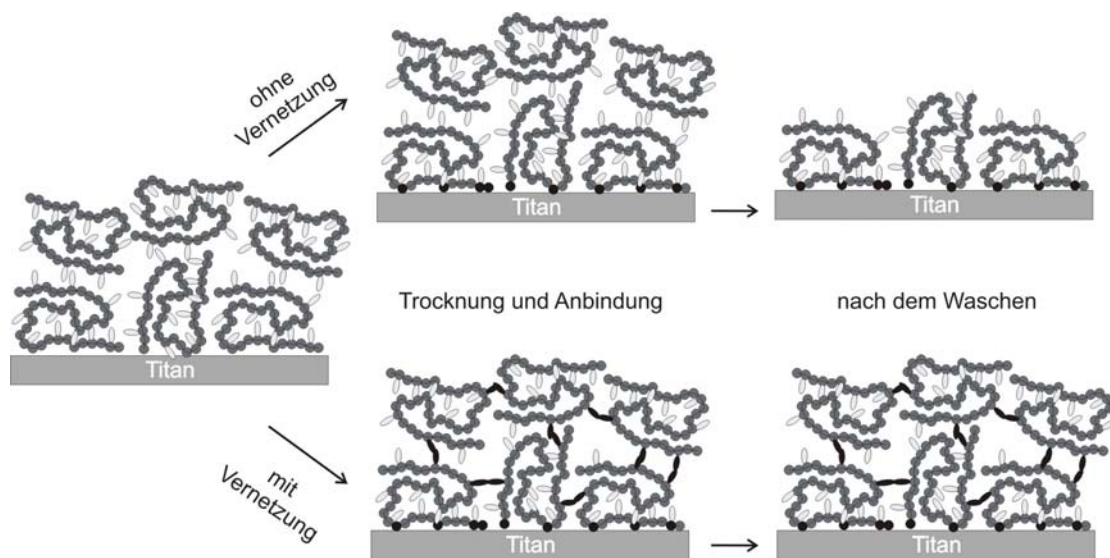


Abbildung 73: Polymerschichten mit und ohne intermolekulare Vernetzung

Trotz der zusätzlichen Vernetzung ist es möglich, die Schichtdicke einzustellen, wenn die experimentellen Parameter entsprechend gewählt werden. Eine Einflussgröße ist beispielsweise die Konzentration der verwendeten spin-coating-Lösungen. An Hand von verschiedenen konzentrierten Lösungen von Copolymeren mit unterschiedlichen Zusammensetzungen konnte bestätigt werden, dass die Schichtdicke mit steigender Konzentration der Lösungen nahezu linear zunimmt. Wie Abbildung 74 zeigt, bildet sich aus

einem Polymer mit 75 % GMA bei einer Konzentration von 3 mg/mL eine Polymerschicht von 24 nm, die standardmäßig verwendete Konzentration von 10 mg/mL resultiert hier sogar in einer Schichtdicke von 82 nm. Ähnliche Ergebnisse werden bei einer Zusammensetzung mit 84 % GMA erhalten.

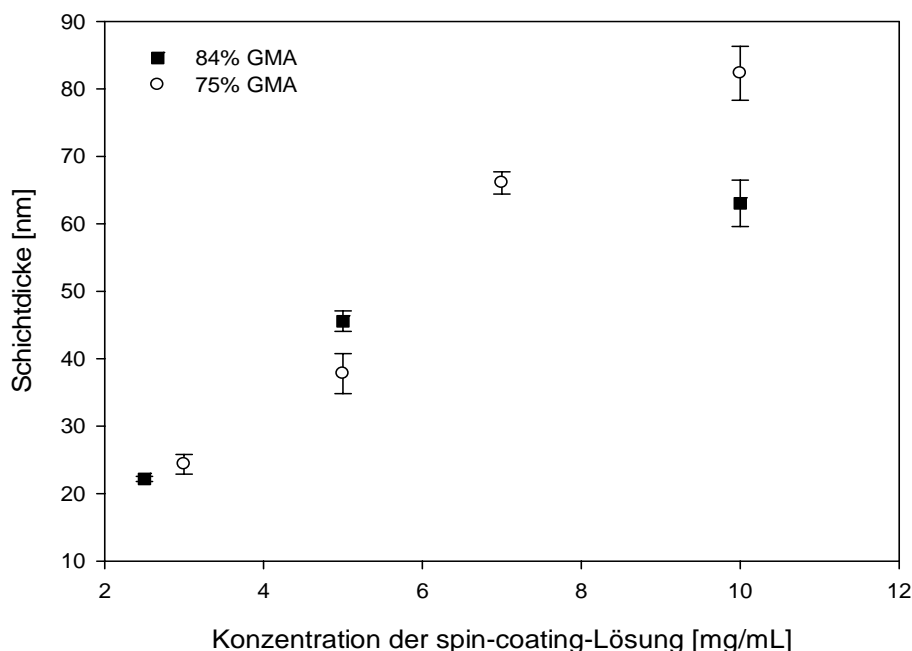


Abbildung 74: Schichtdicke in Abhängigkeit von der Konzentration der spin-coating-Lösung für Poly-VBP-co-GMA mit unterschiedlichen Anteilen an GMA

Neben dem spin-coating ist es auch möglich, Polymerfilme durch Tauchprozesse herzustellen. Dies ist insbesondere bei dem Einsatz von Implantaten mit komplexen Geometrien ein häufig genutztes Verfahren. Für SAMs aus Phosphonsäuren hat sich dabei die T-BAG-Methode bewährt, mit deren Hilfe beispielsweise gleichmäßige Monoschichten aus Octadecylphosphonsäure auf Silizium hergestellt wurden.^[228] Dieses Verfahren kann jedoch nicht direkt auf die Herstellung von Filmen aus Poly-VBP-co-GMA übertragen werden, da sich durch die unterschiedlichen Verdampfungszeiten eine bereits mit dem bloßen Auge sichtbare wellenartige Struktur auf der Oberfläche ausbildet. Durch diverse Modifikationen wurden von Nico Timpe im Rahmen eines Vertiefungspraktikums schließlich zwei Methoden entwickelt, die es ermöglichen, homogenere und reproduzierbare Polymerfilme herzustellen.^[245] Dabei wird bei Methode A das Substrat ähnlich der T-BAG-Methode senkrecht in die Polymerlösung getaucht, jedoch wird ein Verdampfen des Lösungsmittels verhindert und die Probe nach 90 Minuten aus der Lösung herausgezogen. Bei Methode B werden die 90 Minuten unterbrochen, indem jeweils nach 30 und 60 Minuten die Probe aus der Lösung herausgezogen und anschließend wieder eingetaucht wird. Die in Abbildung 75

dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit diesen Methoden deutlich dünnere Schichten als mittels spin-coating erhalten werden können.

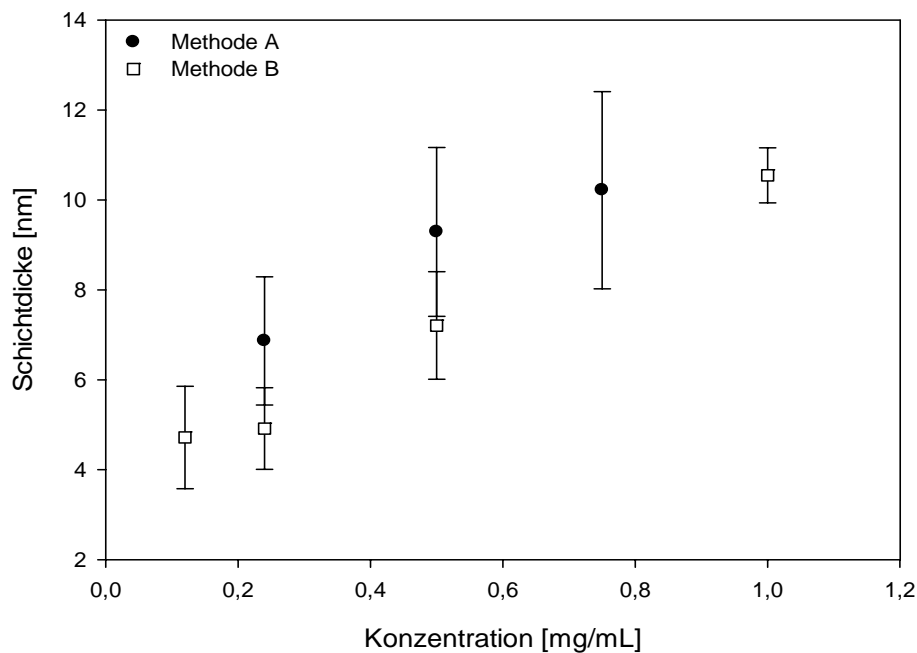


Abbildung 75: Abhängigkeit der Schichtdicke von der Konzentration der im Tauchprozess verwendeten Lösungen von Poly-VBP-co-GMA

Die mit beiden Methoden hergestellten Filme zeigen dabei eine deutliche Abhängigkeit der Schichtdicke von der Konzentration der verwendeten Tauchlösung. Methode A liefert jedoch etwas dickere Schichten, die zudem eine recht große Standardabweichung aufweisen, so dass für die Herstellung von Filmen aus Poly-VBP-co-GMA mit Hilfe eines Tauchprozesses Methode B die bessere Wahl zu sein scheint. Damit können sowohl flache Plättchen als auch dreidimensionale Implantate beschichtet werden, so dass eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse gegeben ist.

9.1.2 Kontaktwinkel

Die Kontaktwinkel als Maß für die Hydrophilie der Oberfläche weisen im Gegensatz zu der Schichtdicke eine deutliche Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Copolymers auf. Mit steigendem Anteil an Vinylbenzylphosphonat steigt auch der Kontaktwinkel, da auf Grund des aromatischen Ringes die Hydrophobie des Polymers erhöht wird. In Abbildung 76 sind die fortschreitenden Kontaktwinkel für verschiedene Versuchsreihen dargestellt, die rückschreitenden Kontaktwinkel werden aus Gründen der Übersichtlichkeit an dieser Stelle nicht gezeigt, die Abbildung befindet sich jedoch im Anhang.

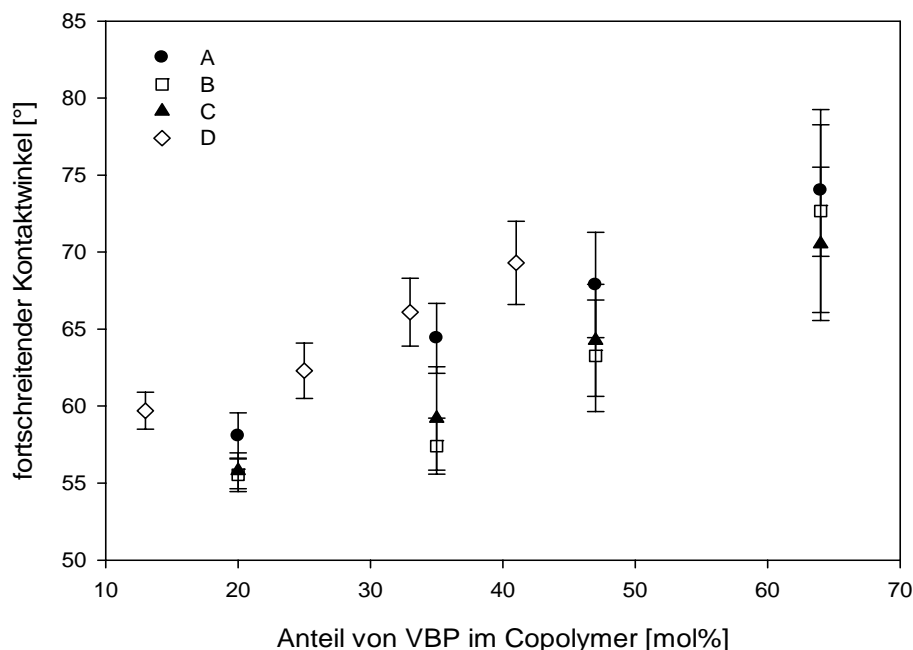


Abbildung 76: fortschreitender Kontaktwinkel in Abhängigkeit von der Zusammensetzung

Zwischen dem fortschreitenden und rückschreitenden Kontaktwinkel gibt es jeweils eine Hysterese von im Mittel etwa 7° , die in Anbetracht einer Standardabweichung von etwa 4° nicht so sehr ins Gewicht fällt, aber dennoch einen Hinweis auf mögliche Inhomogenitäten in den Filmen gibt. Daher wurde die Topologie der Oberflächen mittels REM und AFM untersucht. Abbildung 77 zeigt REM-Aufnahmen eines Films aus Poly-VBP-co-GMA mit 20 % VBP. Die Beschichtung scheint zunächst homogen und es ist eine gleichmäßige Verteilung von erhöhten Flächen sichtbar. Bei einer stärkeren Vergrößerung zeigt sich, dass es sich dabei um unregelmäßig geformte Aggregate handelt, deren Kantenlänge zwischen 1 und 3 μm beträgt.

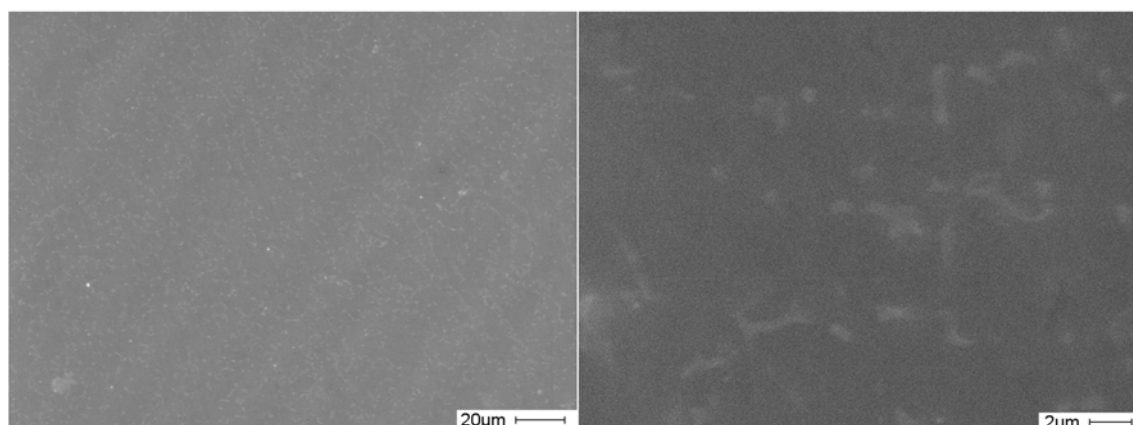


Abbildung 77: REM-Aufnahme eines Films aus Poly-VBP-co-GMA mit 20 % VBP, Schichtdicke $43 \pm 1\text{nm}$

Bei einem Film aus Poly-VBP-co-GMA mit einem Anteil von 47 % VBP konnte im Vergleich dazu keine so gleichmäßige Bedeckung beobachtet werden. Stattdessen bilden sich Agglomerate, deren Kantenlänge zwischen 15 und 20 μm beträgt (vgl. Abbildung 78). Eine weitere Vergrößerung zeigt, dass diese ebenfalls aus planaren Aggregaten unregelmäßiger Größe und Gestalt aufgebaut sind, die sich zusammenlagern.

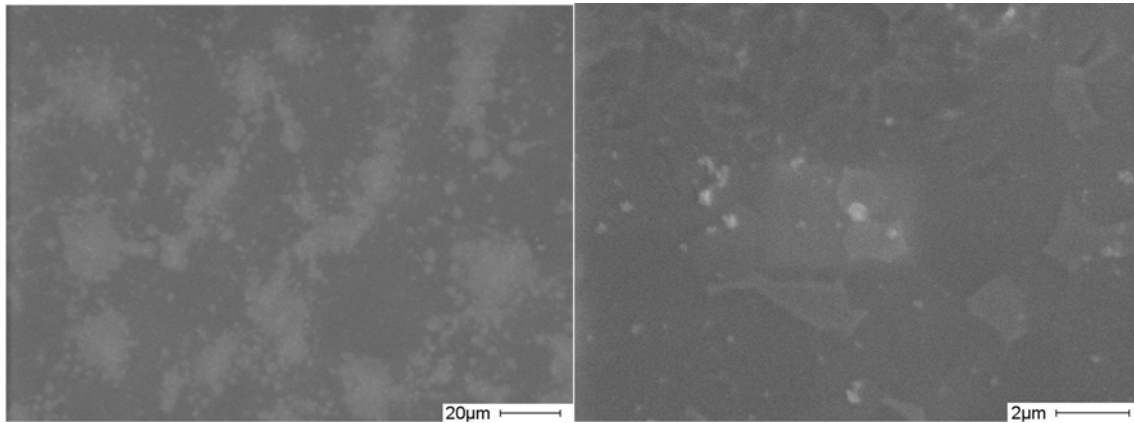


Abbildung 78: REM-Aufnahme eines Films aus Poly-VBP-co-GMA mit 47 % VBP, Schichtdicke $35 \pm 3 \text{ nm}$

AFM-Aufnahmen erlauben weiterhin eine Betrachtung des Höhenprofils der Beschichtungen. Die in Abbildung 79 dargestellte Aufnahme zeigt, dass der untersuchte Bereich des Plättchens Höhenunterschiede von 30 nm aufweist. Aus dem Copolymer bildet sich eine diffuse Beschichtung, die in einigen Bereichen Höhen von 20 nm aufweist, aber auch Bereiche mit etwa 10 nm enthält. Zusätzlich gibt es noch Bereiche mit Kantenlängen von etwa 0,8 μm , deren Höhe 30 nm über der geringsten gemessenen liegt. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um weitere Polymerelemente. Von der Form her entsprechen sie in etwa den Aggregaten, die auf den REM-Bildern zu erkennen sind, die Größenunterschiede können zum einen durch die Wahl des Ausschnitts bedingt sein, zum anderen handelt es sich um Copolymere unterschiedlicher Zusammensetzung, so dass ein Einfluss der Anteile der jeweiligen Monomere nicht ausgeschlossen werden kann.

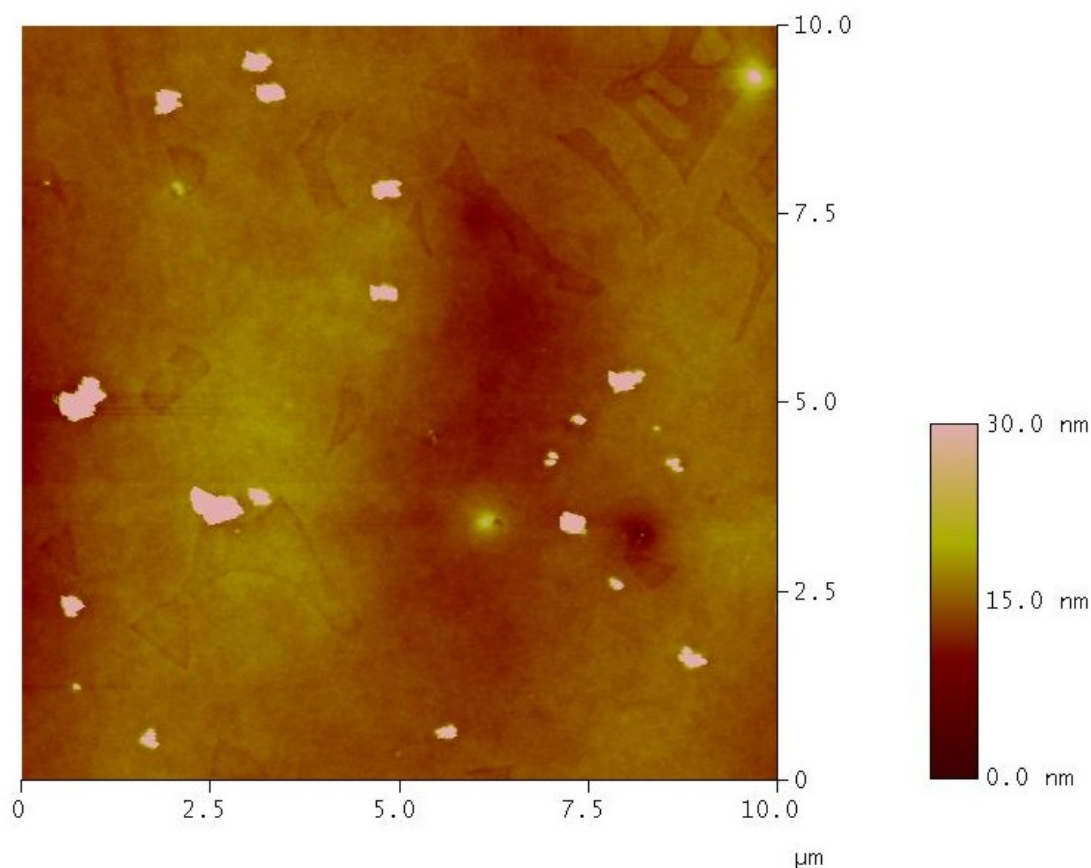


Abbildung 79: AFM-Aufnahme eines spin-coating-Films von Poly-VBP-co-GMA mit 28 % VBP, Schichtdicke $50,5 \pm 0,7$ nm

Die Resultate aus den REM- und AFM-Untersuchungen helfen auch eine weitere Beobachtung bei den Kontaktwinkeln zu erklären. Bei genauerer Betrachtung der Kontaktwinkel fällt auf, dass sich die Werte der Kontaktwinkel für eine Copolymerzusammensetzung in den verschiedenen Reihen unterscheiden. Eine detaillierte Untersuchung der Werte hat gezeigt, dass die Kontaktwinkel ebenfalls von der Schichtdicke abhängen, daher ist in Abbildung 80 der fortschreitende Kontaktwinkel für Copolymerfilme verschiedener Zusammensetzungen in Abhängigkeit von der Schichtdicke aufgetragen.

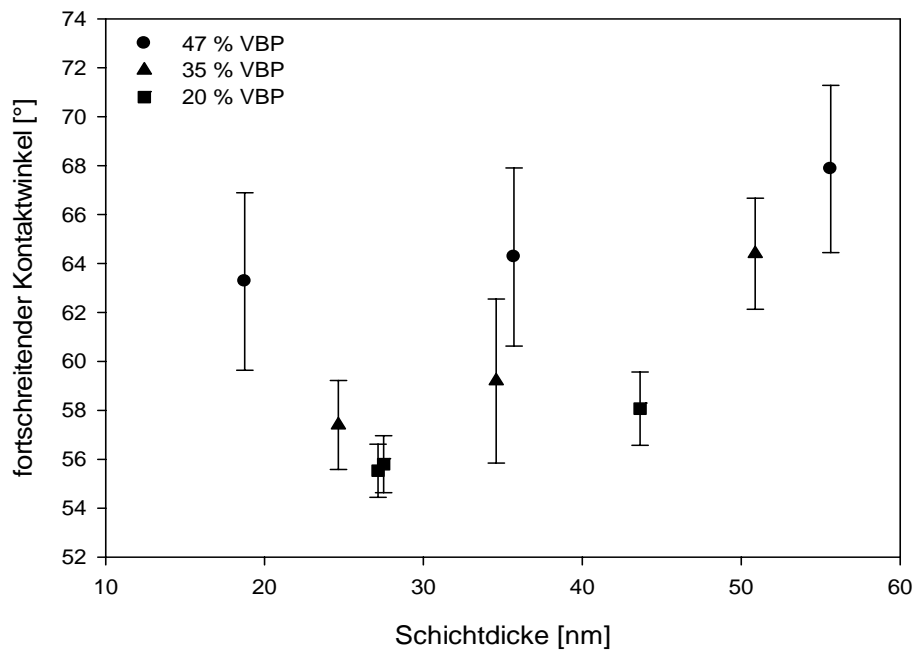


Abbildung 80: Kontaktwinkel in Abhängigkeit von der Schichtdicke für Filme aus Poly-VBP-GMA mit verschiedenen Anteilen an VBP

Wird für eine Copolymerzusammensetzung der jeweilige fortschreitende Kontaktwinkel in den verschiedenen Experimenten betrachtet, zeigt sich eine Zunahme des Kontaktwinkels mit wachsender Schichtdicke. Wie oben erklärt, bestehen die Filme nicht aus einer homogenen Schicht, sondern besitzen unregelmäßige Partikel im Mikrometermaßstab. Der Messfleck des Ellipsometers hat einen Durchmesser von etwa einem Millimeter, so dass die Schichtdicke jeweils über diesen Bereich gemittelt wird. Eine höhere Gesamtschichtdicke ergibt sich daher durch einen Anstieg der Anzahl der Partikel auf der Oberfläche und einer verbesserten Homogenität, so dass der Kontaktwinkel stärker die tatsächliche Hydrophobie des Polymers widerspiegelt als bei einem dünneren, inhomogenen Film.

9.1.3 Quellungseigenschaften

Die hohe Schichtdicke im Vergleich zu den Monoschichten sowie die geringe Reproduzierbarkeit legen die Vermutung nahe, dass ein Netzwerk ausgebildet wird und als ein solches sollte die Polymerschicht in der Lage sein, Wasser aufzunehmen und zu quellen. Mit Hilfe einer speziellen Flüssigkeitszelle für das Ellipsometer kann die Schichtdicke an der Fest-Flüssig-Phasengrenze verfolgt werden. Im Hinblick auf die Anwendung auf Implantaten ist es zunächst interessant, die Kinetik der Quellung zu untersuchen. Dazu wird eine Messmethode gewählt, die alle drei Sekunden einen Messwert aufnimmt. Nach Bestimmung der Ausgangsschichtdicke an Luft wird zwischen der Aufnahme zweier Messpunkte die

Flüssigkeit hinzugegeben. Dabei zeigt sich, dass die Schichtdicke sehr schnell ansteigt und sofort ihren Endwert erreicht. Die Quellung selbst kann daher zeitlich nicht aufgelöst werden. In Abbildung 81 ist eine Messung als Beispiel dargestellt.

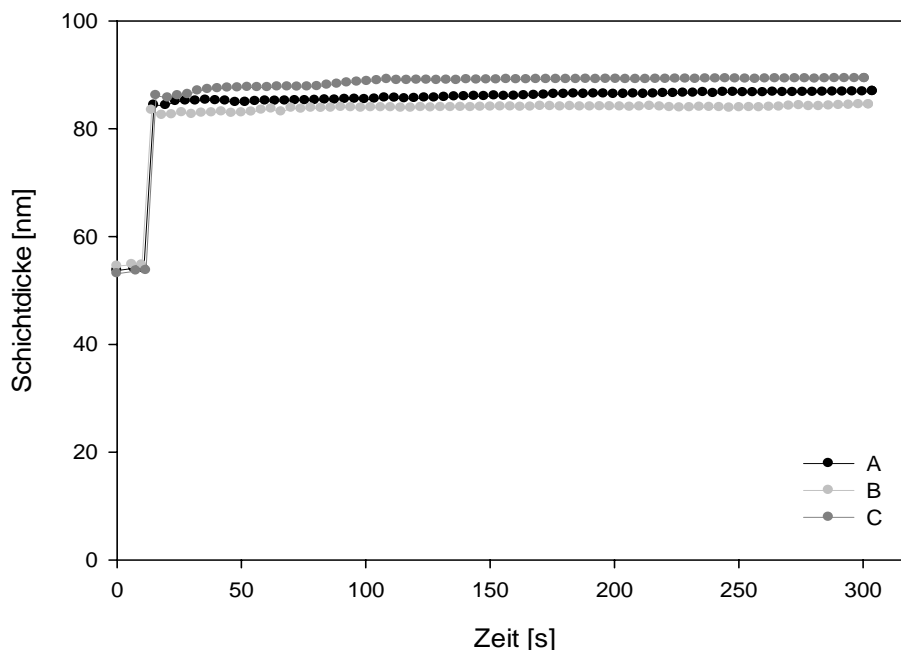


Abbildung 81: Zunahme der Schichtdicke des Poly-VBP-co-GMA-Films (8 % VBP) in Millipore-Wasser, A-C entsprechen drei Messungen auf demselben Titanplättchen zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Messungen A-C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, so dass die Variation der Ausgangsschichtdicke auf verschiedene Messpunkte auf der Probe zurückzuführen ist.

Da mit den vorhandenen Methoden keine zeitaufgelöste Zunahme der Schichtdicke messbar ist, wird die Untersuchung der Quellungseigenschaften in verschiedenen Medien nur noch als Punkt-Messung durchgeführt. Abbildung 82 zeigt die Schichtdicke des in unterschiedlichen Medien gequollenen Films aus Poly-VBP-co-GMA. In Millipore-Wasser ist nur eine geringe Zunahme der Schichtdicke im Vergleich zu dem Film an Luft zu beobachten, in MES- und Phosphat-Puffer hingegen steigt die Schichtdicke auf nahezu das doppelte an.

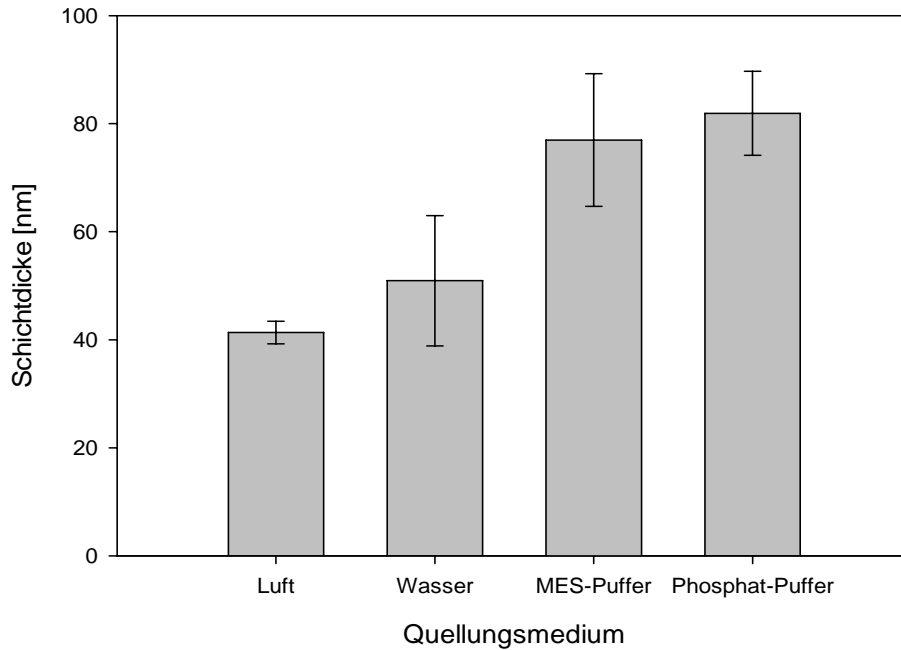


Abbildung 82: Schichtdicke von Filmen aus Poly-VBP-co-GMA in verschiedenen Medien, Mittelwert aus 3 Messungen pro Platte und 6 Plättchen der gleichen Beschichtung

Ein möglicher Einflussfaktor ist der pH-Wert der verwendeten Lösungen. Bei vernetzten Gelen aus Copolymeren ist in der Regel folgende Abhängigkeit vom pH-Wert zu beobachten: Anionische/saure Gele quellen mit zunehmendem pH-Wert, während basische/kationische Gelen mit steigendem pH-Wert schrumpfen.^[246] Gele aus N-Isopropylacrylamid ändern ihr Verhalten beispielsweise in Abhängigkeit vom Comonomer: Durch Copolymerisation mit Natrium-Acrylat entstehen saure Gele, die bei steigendem pH-Wert quellen. Mit 2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat hingegen wird das Gel schwach basisch und die Quellsfähigkeit nimmt mit steigendem pH-Wert ab.^[247] Poly-VBP-co-GMA enthält allerdings keine funktionelle Gruppe, die leicht ionisierbar ist wie beispielsweise eine Säurefunktion oder eine Aminogruppe. Möglich wäre jedoch, dass es sich um eine Art amphiphiles Gel handelt. Amphiphile Gele sind aus Copolymeren, die anionisch und kationisch ionisierbare Einheiten enthalten, hergestellte Gele, so dass deren Quellverhalten stark vom pH-Wert, der Ionenstärke und den Anteilen der jeweiligen Monomeren abhängig ist. Bei einem bestimmten pH-Wert zeigen diese Gele ein Minimum im Quellgrad, bei niedrigeren oder höheren pH-Werten steigt der Quellgrad jedoch an.^[248] Dies stimmt jedoch nicht ganz mit den beobachteten Ergebnissen überein, da in Millipore-Wasser und MES-Puffer, deren pH-Werte beide zwischen 5 und 6 liegen, unterschiedliche Quellgrade beobachtet werden können. Zur Verifizierung dieses Ansatzes müssen daher noch weitere Untersuchungen der Schichtdicke in Abhängigkeit vom pH-Wert durchgeführt werden. Ein weiterer möglicher Einfluss ist die Ionenstärke, welche bei den verwendeten Puffern höher liegt als die von Millipore-Wasser. In

der Regel wird jedoch beobachtet, dass der Quellgrad mit steigender Ionenstärke abnimmt.^[247] Für Gele aus Acrylamid und Acrylsäure konnte jedoch gezeigt werden, dass es in neutralen Lösungen eine Ionenstärke gibt, bei der ein maximaler Quellgrad auftritt, während bei geringeren und höheren Ionenstärken die Quellung geringer ist.^[249] Zur Bestätigung dieser Abhängigkeit bedarf es ebenfalls weiterer Untersuchungen.

9.1.4 XPS

Die Photoelektronenspektroskopie erlaubt eine weitere Charakterisierung der Filme aus Poly-VBP-co-GMA. Als Verunreinigung wurde auf dem Plättchen mit dem Polymer mit 43 % VBP in einer von drei Messungen 3,2 % Fluor gefunden, außerdem enthalten alle Beschichtungen im Mittel zwischen 1,4 und 1,9 % Silizium. Dabei handelt es sich vermutlich um Silan-Verunreinigungen, die in größeren Mengen problematisch werden, da Silane ebenfalls an Titan anbinden können^[190] und somit mit den Phosphonatgruppen in Konkurrenz treten. Auf drei von vier Plättchen wurden jeweils zwischen 0,1 und 0,3 % Titan gemessen. Der sehr geringe Anteil deutet darauf hin, dass die Polymerschichten recht dick sind, da die Eindringtiefe des Photonenstrahls auf wenige Nanometer begrenzt ist. Abbildung 83 zeigt die atomaren Konzentrationen der Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor, die sich nach Abzug der Verunreinigungen sowie dem Titan aus den Übersichtsspektren ergeben.

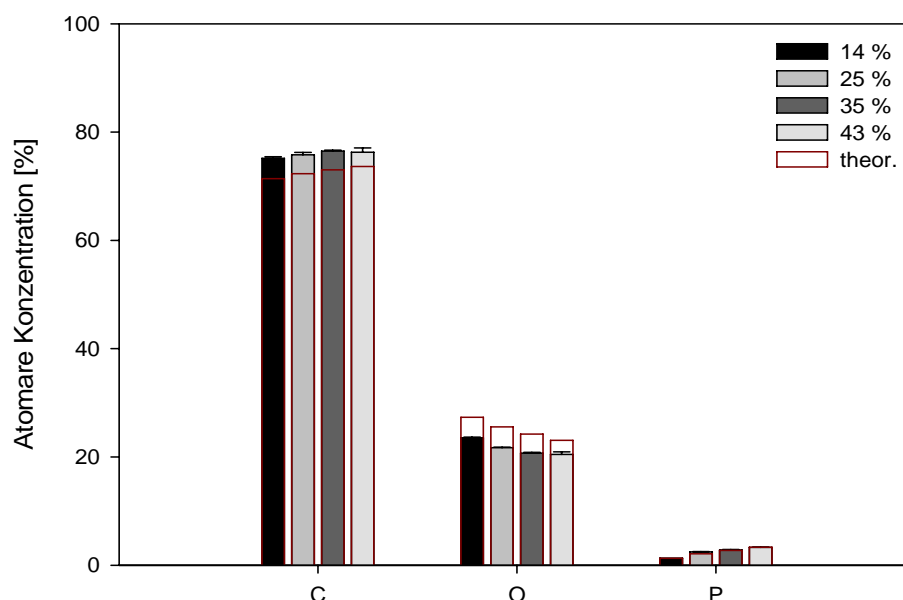


Abbildung 83: Konzentration von Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor in Filmen aus Poly-VBP-co-GMA in Abhängigkeit vom Anteil an VBP im Copolymer

Der gemessene Anteil an Kohlenstoff ist bei allen Zusammensetzungen um einige Prozent höher als der auf Grund der theoretischen Berechnungen erwartete Wert. Diese Differenz

entsteht höchstwahrscheinlich durch Verunreinigungen mit aliphatischen Kohlenwasserstoffen, die angesichts der Herstellungs- und Lagerungsbedingungen jedoch nicht vermeidbar sind. Im Gegensatz dazu ist der gemessene Anteil an Sauerstoff stets geringer als der Erwartungswert. Teilweise trägt der auf Grund der Verunreinigungen erhöhte Kohlenstoffanteil dazu bei, vollständig erklärt werden kann dies jedoch nicht. An Hand des Phosphor-Anteils sind besonders gut die Änderungen der Zusammensetzungen des Copolymers nachzuvollziehen, da der Anteil an Phosphor mit steigendem Anteil an VBP im Copolymer wächst. Der Anteil an Phosphor wird am wenigsten von Kontaminationen beeinflusst, so dass die gute Übereinstimmung der Messwerte mit den erwarteten Anteilen auf eine korrekt bestimmte Zusammensetzung des Copolymers und das Vorhandensein entsprechender Mengen an VBP hinweist.

Die hochaufgelösten Spektren des Kohlenstoffs in Abbildung 84 liefern weitere Hinweise auf die Zusammensetzung des Films. Poly-VBP-co-GMA enthält vier unterschiedliche Arten von Kohlenstoffatomen, die wie folgt zugeordnet werden können. Die Kohlenstoffe des Polymerrückgrates sowie die aromatischen des VBPs besitzen eine Verschiebung von 285 eV (C_1). Kohlenstoffe aus dem VBP, die direkt an Sauerstoff oder Phosphor gebunden sind sowie die Methylengruppe im GMA außerhalb des Epoxidringes erfahren eine Verschiebung von 286,2 eV (C_2). Die beiden Kohlenstoffe im Epoxidring schließlich werden einer Bindungsenergie von 287 eV (C_3) zugeordnet und der Carbonylkohlenstoff der Methacrylatgruppe dem Peak bei 289 eV (C_4).

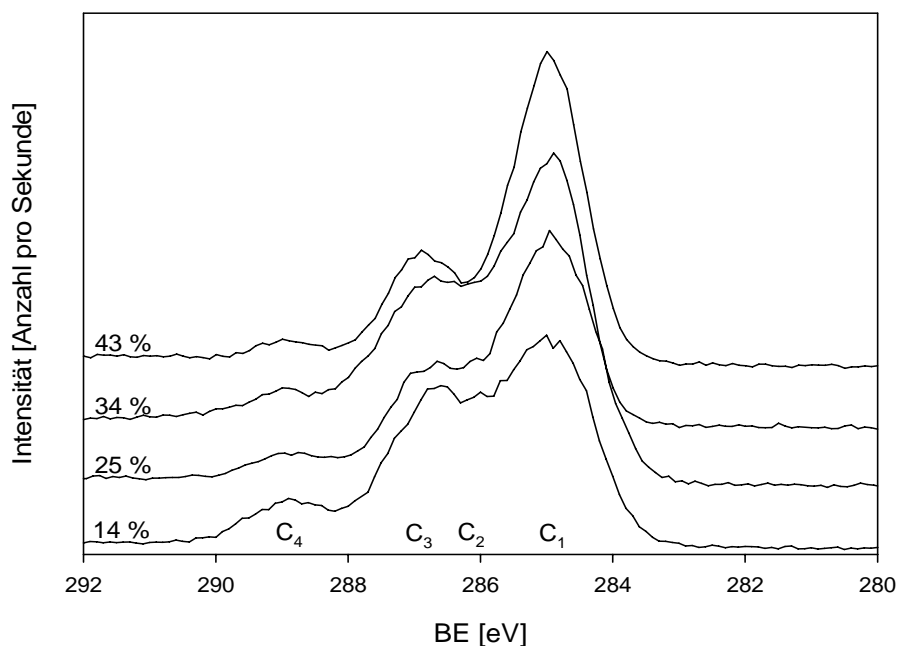


Abbildung 84: Hochaufgelöste Kohlenstoff-Spektren von Filmen aus Poly-VBP-co-GMA mit verschiedenen Anteilen an VBP

Basierend auf dieser Interpretation der Signale ist aus Abbildung 84 gut ersichtlich, dass der C₄-Peak bei 289 eV mit zunehmendem Anteil an VBP abnimmt. Dies entspricht den Erwartungen, da dieser Peak charakteristisch für die funktionelle Gruppe im GMA ist und den abnehmenden Anteil von GMA im Copolymer bestätigt. Zudem ist die Abnahme des C₃-Peaks bei 287 eV erkennbar, auf Grund der Ausbildung einer Schulter auf der linken Seite des großen Peaks allerdings nicht so eindeutig. Auch diese Beobachtung stimmt mit den Erwartungen überein, da der C₃-Peak nur Kohlenstoffen des GMAs entspricht. Der C₁-Peak wird größtenteils durch die aromatischen Kohlenstoffe des VBPs erzeugt, so dass die Vergrößerung des Peaks bei zunehmendem Anteil an VBP mit dieser Korrelation zu erklären ist. Mit Hilfe eines Fits, mit dem die jeweiligen gemessenen Kurven in Peaks für die einzelnen Kohlenstoffe unterteilt werden, kann nun der quantitative Anteil der entsprechenden Kohlenstoffarten bestimmt werden. Abbildung 85 zeigt diese Anteile im Vergleich mit den Erwartungswerten, die mit Hilfe der Zusammensetzung der Copolymere berechnet wurden.

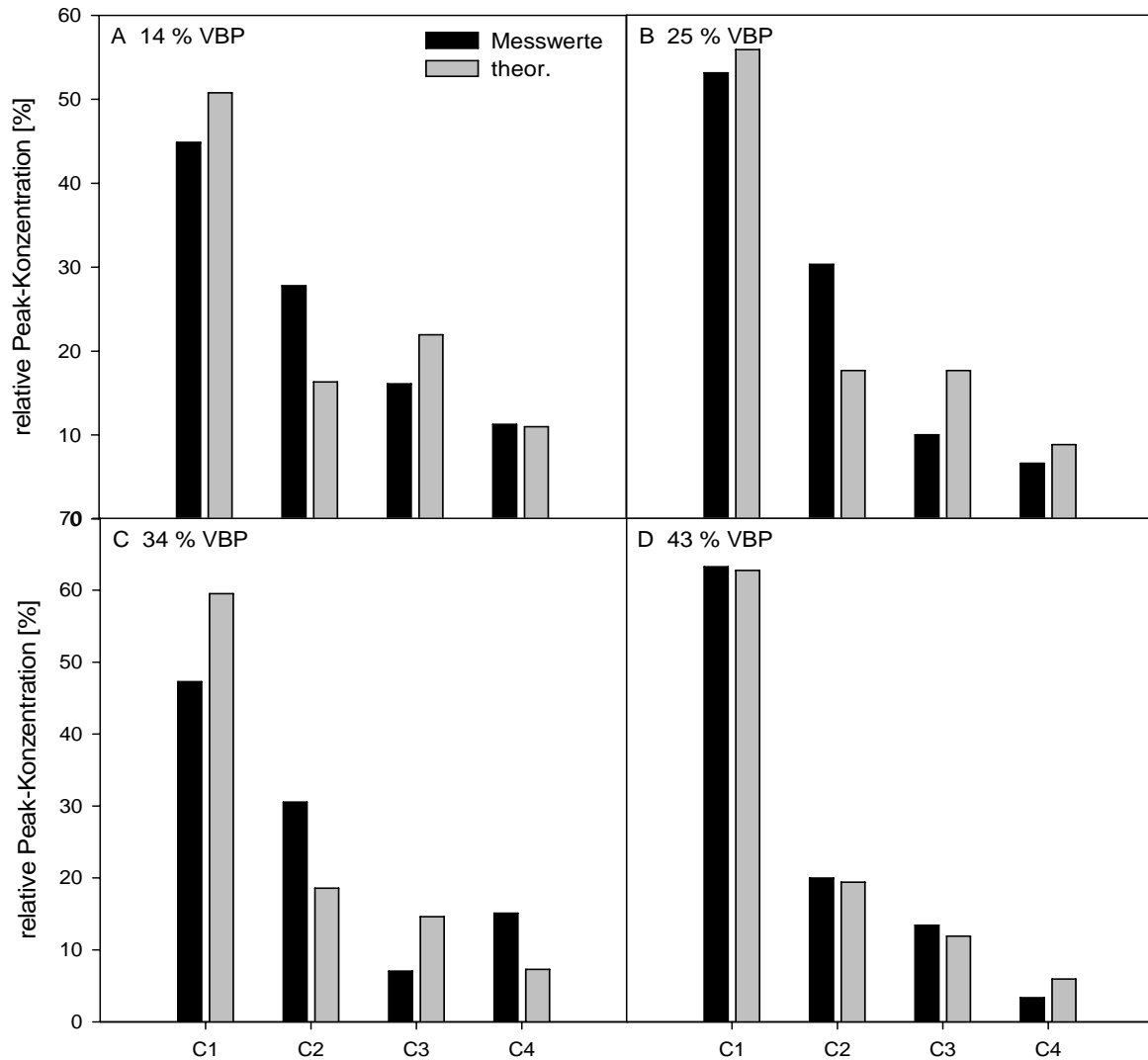


Abbildung 85: Hochaufgelöste Kohlenstoff-Spektren von Filmen aus Poly-VBP-co-GMA mit verschiedenen Anteilen an VBP

Die beste Übereinstimmung ist bei dem Film des Copolymers mit 43 % VBP (Abschnitt D) zu beobachten, die Differenz zwischen den Messwerten und den Erwartungswerten beträgt maximal 3 %. Die Copolymerfilme mit 14 %, 25 % und 34 % VBP weisen bei C₂ und C₃ eine Abweichung von bis zu 10 % von den Erwartungswerten auf. Diese könnte jedoch mit den Erläuterungen aus Kapitel 9.2 begründet werden. Dort wurde postuliert, dass die recht hohen Schichtdicken durch einen Vernetzungsprozess entstehen, der durch die Öffnung der Epoxidringe initiiert wird. C₃ spiegelt nun genau die Kohlenstoffe im Epoxidring wieder und der geringere als erwartete Anteil könnte dafür sprechen, dass ein Teil der Epoxidringe zugunsten der Bildung von Etherbindungen, deren Kohlenstoffe dem C₂-Peak zugeordnet werden können, aufgebrochen wird. Im Copolymerfilm mit 34 % VBP sind allerdings zusätzlich deutliche Abweichungen bei den Peaks von C₁ und C₄ zu finden, das heißt, die

Messkurve lässt sich mit dem gewählten Fit nicht hinreichend darstellen. Da jeweils nur eine Position auf einem einzigen Plättchen untersucht wurde, bleibt an dieser Stelle die Frage offen, ob die Abweichung von den Erwartungswerten durch Verunreinigungen auf dem Plättchen hervorgerufen wird oder ob die gewählte Interpretation noch nicht in der Lage ist, die Messdaten optimal wiederzugeben. Beide Möglichkeiten können nur mit Hilfe von weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

9.2 *In-vitro*-Untersuchungen

In-vitro-Untersuchungen sind bei der Entwicklung von Medizinprodukten eine wichtige Methode, um bereits vor dem Einsatz im Tier mögliche Komplikationen ausschließen zu können. Zur Überprüfung der Biokompatibilität der verwendeten Polymerschichten werden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Das erste Verfahren, welches auch von ADDEN im Rahmen eines Screenings auf für Implantatbeschichtungen geeignete Polymere^[193] verwendet wurde, beruht auf der Untersuchung der Zellmorphologie als Indiz für Biokompatibilität. Dazu werden genetisch veränderte C3H10T $\frac{1}{2}$ Zellen, die stabil humanes BMP2 exprimieren und einen Fibroblasten-Phenotyp aufweisen, eingesetzt. Wenn Konfluenz erreicht wird, beginnt der BMP2-abhängige Differenzierungsprozess in Osteoblasten.^[250] Die Zellen besitzen daher *in vitro* Osteoblasten-Eigenschaften und können deshalb als Modell für die Wechselwirkung zwischen Polymer und Zellen und somit zur Vorhersage der Biokompatibilität verwendet werden.

Um die Morphologie der Zellen mit einem Phasen-Kontrast-Mikroskop verfolgen zu können, werden zunächst transparente Proben hergestellt. Da Titan und dessen Legierungen mit einer natürlichen Oxidschicht von 3-7 nm^[6] bedeckt sind, wurden um eine möglichst ähnliche Oberfläche zu schaffen und somit die Anbindungschemie nicht zu beeinflussen, am FORTIS Witten Glasplatten in einem PVD-Prozess mit einer Titanoxidschicht versehen. Anschließend wurden die Glasplatten mit dem Copolymer Poly-VBP-co-GMA mit 15 % VBP sowie Poly-VBP beschichtet. Die Kontaktwinkel für Filme aus Poly-VBP-co-GMA erreichen Werte von $60 \pm 2^\circ$ für den fortschreitenden und $46 \pm 2^\circ$ für den rückschreitenden Winkel, die mit denen, die auf Ti6Al4V erhalten werden ($59 \pm 1^\circ$ und $48 \pm 2^\circ$) übereinstimmen, so dass von einer erfolgreichen Beschichtung ausgegangen wird.

Die Aussaat der Zellen auf den Glasplatten und die Beobachtung des Zellwachstums erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Die Quantifizierung wurde am 4. Tag nach der Aussaat durchgeführt und fotografisch dokumentiert. Zellen mit einer für Fibroblasten charakteristischen oder sternförmigen Morphologie werden als vital betrachtet, runde Zellen

hingegen sind nicht gesund, teilen sich nicht oder weisen, wenn sie in großen Mengen vorkommen, auf Zelltoxizität hin.

Das Wachstum der Zellen auf den mit Titanoxid beschichteten Plättchen ist etwas langsamer als das in den zur Kontrolle verwendeten TCPS-Petrischalen und entspricht damit vorangegangenen Untersuchungen.^[193] Die Zellen auf TCPS sind bereits am 3. Tag nach der Aussaat konfluent, am 4. Tag erreichen die Zellen auf den mit Titanoxid beschichteten Plättchen Konfluenz und die Poly-VBP-Plättchen sind mit einer Bedeckung von 95 % nahezu konfluent. Eine Gegenüberstellung der Zellbedeckung auf Titanoxid und Poly-VBP findet sich in Abbildung 86.

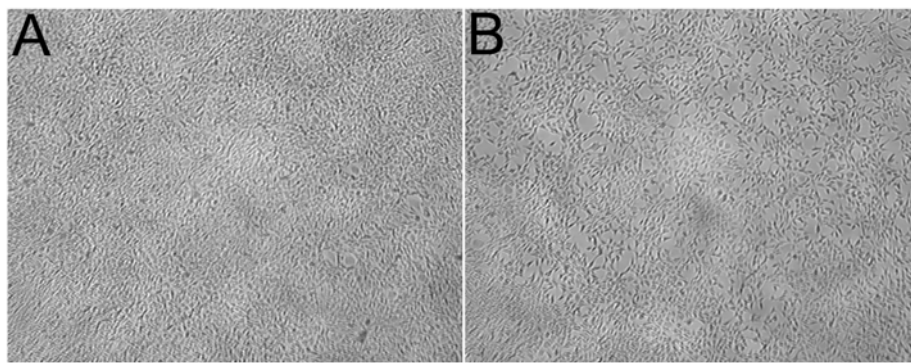


Abbildung 86: Zellwachstum auf A: Titanoxid (konfluent) und B: Poly-VBP

Die Untersuchung der Zellmorphologie am 3. Tag nach der Aussaat zeigt, dass sich auf den mit Poly-VBP-co-GMA beschichteten Platten etwa 20 % runde Zellen befinden, während auf den mit Poly-VBP beschichteten Plättchen nur 10 % und auf den reinen Titanoxidplättchen nur 5 % runde Zellen sind. Am 4. Tag nach der Aussaat werden nur noch auf den mit Poly-VBP-co-GMA beschichteten Plättchen runde Zellen gefunden, die Zellen auf den Kontrollplättchen und den mit Poly-VBP beschichteten Proben sind alle adhäriert und zeigen die charakteristische Morphologie von Fibroblasten. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem verlangsamten Wachstum auf den Poly-VBP-co-GMA-Plättchen, die am 4. Tag nach der Aussaat lediglich eine Bedeckung von 85 % erreichen, während hingegen 95 % der mit Poly-VBP beschichteten Plättchen von Zellen bedeckt sind. Die Aufnahmen in Abbildung 87 zeigen die Besiedelung auf drei Plättchen mit der gleichen Beschichtung, auf denen die unvollständige Bedeckung und bei stärkerer Vergrößerung sowohl die sternförmige Morphologie der vitalen als auch die runden ungesunden Zellen (in Bild D durch Pfeile markiert) zu erkennen sind.

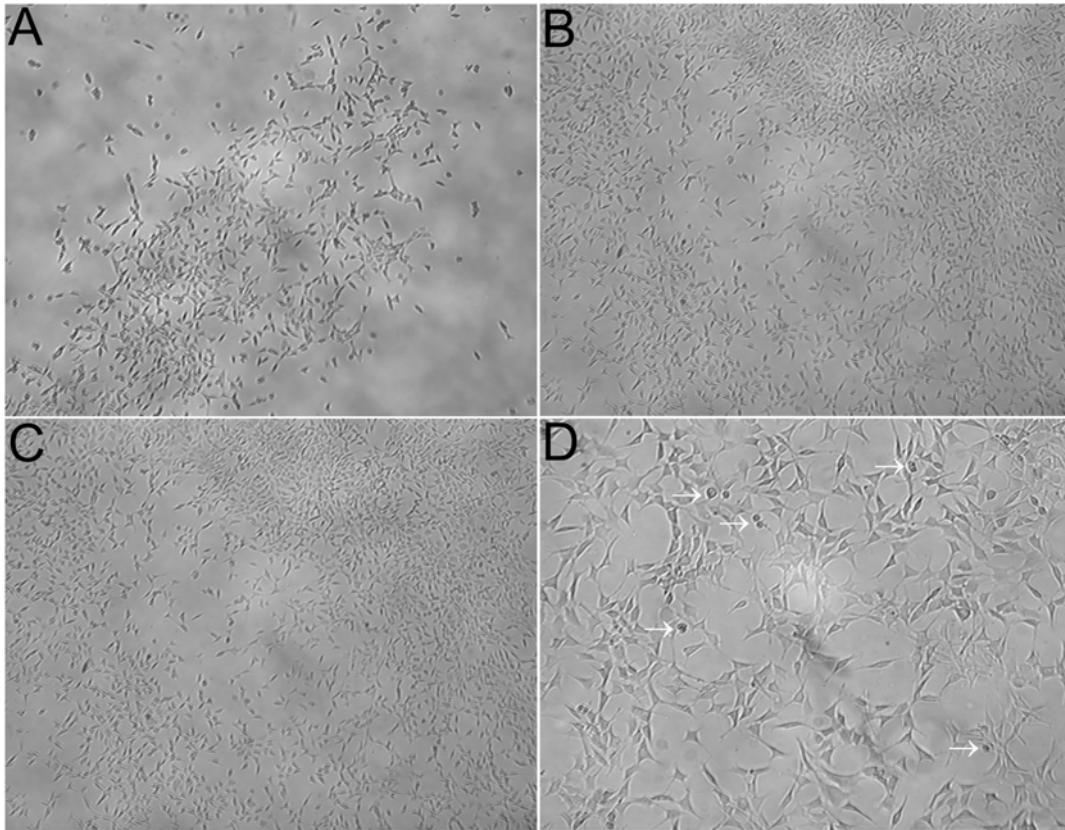


Abbildung 87: Zellwachstum auf Poly-VBP-co-GMA. A-C: drei Plättchen mit 10facher Vergrößerung, D: 40fache Vergrößerung von Plättchen C, Pfeile markieren runde Zellen

Die Quantifizierung des Zellbewuchses in Abbildung 88 zeigt, dass auf Poly-VBP deutlich weniger Zellen wachsen als auf den Titanoxid-beschichteten Plättchen. Die Besiedelung der mit Poly-VBP-co-GMA beschichteten Plättchen A-C schwankt von Probe zu Probe, ist jedoch im Mittel nur etwas geringer als die von Poly-VBP.

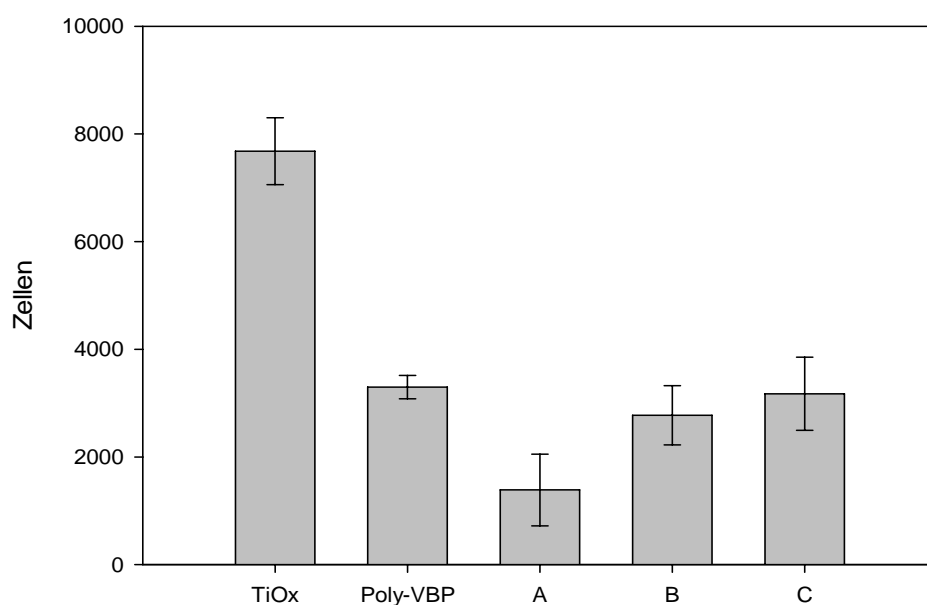


Abbildung 88: Quantifizierung der Zellbesiedelung auf Titanoxid, Poly-VBP und mit Poly-VBP-co-GMA derselben Zusammensetzung beschichteten Plättchen (A-C) entsprechend Abbildung 86 und Abbildung 87.

Ein weiterer Test zur Biokompatibilität beruht auf der Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase aus toten Zellen und wird daher LDH-Test genannt. Dazu wird eine definierte Zellzahl auf den Titanplättchen ausgesät und die adhärenierten Zellen nach 24 beziehungsweise 72 Stunden aufgeschlossen. Die dabei freigesetzte LDH oxidiert unter Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ Lactat zu Pyruvat. Der Katalysator Diaphorase transferiert dann die Protonen von NADH/H^+ zum blassgelben Tetrazolium-Salz, welches zum roten Formazan-Salz reduziert wird.^[251] Aus der Absorption bei 490 nm kann mit Hilfe einer Standard-Reihe die Zellzahl bestimmt werden, dabei wird die auf TCPS bestimmte Zellzahl auf 100 % Bewuchs gesetzt. Da bei diesem Test der Überstand der besiedelten Zellen verwendet wird, kann der Test auf den üblichen Ti6Al4V Plättchen durchgeführt werden. Diese wurden von Marco Wassmann im Rahmen seiner Masterarbeit mit Poly-VBP-co-GMA mit einem Anteil von 28 % VBP beschichtet. Der anschließende LDH-Test wurde von Dr. Andreas Winkel an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Für diesen Test wurden humane Gingiva-Fibroblasten verwendet. Die im vorherigen Test eingesetzten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen besitzen ebenfalls einen fibroblastoiden Charakter, so dass an Hand der Untersuchungen eine Aussage über die Biokompatibilität des Copolymers gegenüber fibroblastoiden Zellen aus verschiedenen Systemen möglich ist.

Abbildung 89 zeigt, dass nach 24 Stunden für die mit Poly-VBP-co-GMA beschichteten Plättchen eine Besiedelung zu 85 % im Vergleich zu TCPS beobachtet werden kann. Das unbehandelte Titan ist nur geringfügig stärker (88 %) mit Zellen bedeckt. Nach 72 Stunden vergrößert sich jedoch dieser Unterschied, der Bewuchs der Poly-VBP-co-GMA-Plättchen sinkt auf 81 %, während der des reinen Titans auf 100 % ansteigt und somit der TCPS-Kontrolle entspricht.

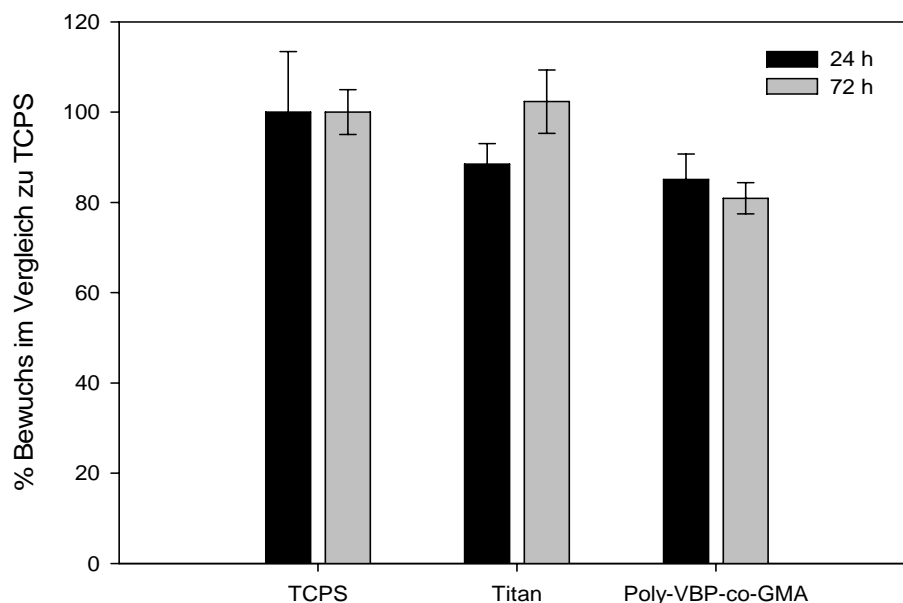


Abbildung 89: Resultate des LDH-Tests

Zusätzlich aufgenommene REM-Bilder zeigen auch hier das Vorkommen von abgerundeten Zellen, ein Beispiel ist in Abbildung 90 dargestellt.

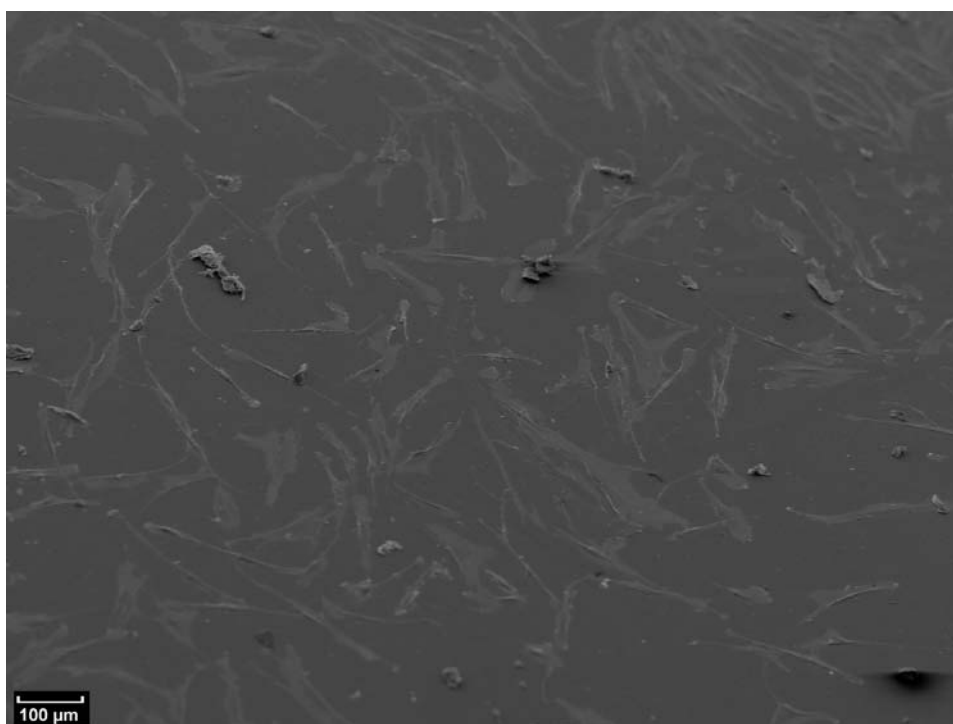


Abbildung 90: REM-Aufnahme von humanen Gingiva-Fibroblasten auf Poly-VBP-co-GMA nach 24 Stunden

Obwohl in den durchgeführten Tests unterschiedliche Verfahren zur Bestimmung sowie unterschiedliche Zelltypen verwendet wurden, wird bei beiden eine Besiedelung von 80-85 % erhalten. Die Untersuchung der Morphologie zeigt, dass bei beiden Tests auch abgerundete Zellen, die auf einen nachteiligen Effekt des Polymers auf die Zellen hindeuten, vorkommen,

jedoch ist deren Anteil gering. Auf Grund der durchgeführten Tests kann somit geschlussfolgert werden, dass die Biokompatibilität der Poly-VBP-co-GMA-Filme gegenüber fibroblastoiden Zellen zwar etwas geringer ist als die des reinen Titans, jedoch ausreichend gut, um damit weitere *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen durchzuführen.

Mit Hilfe eines ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)^[105] kann *in vitro* überprüft werden, ob das gewählte Copolymersystem in der Lage ist, BMP2 anzubinden. Die Untersuchungen wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Dazu werden beschichtete und unbehandelte Kontrollplättchen mit BMP2 inkubiert. Anschließend wird über die Zugabe von Antikörpern und einem Peroxidase-Konjugat ein Farbumschlag erhalten, so dass über die Messung der Absorption die gebundene Menge an BMP mit Hilfe einer Kalibrationsreihe bestimmt werden kann.

Auf Grund des besonderen Verhaltens der Schichtdicke von Filmen aus Poly-VBP-co-GMA wurde zunächst untersucht, ob diese einen Einfluss auf die angebundene Menge besitzt. Um dabei aber möglichst viel Protein zu binden, wurde eine Copolymerzusammensetzung mit 85 % GMA ausgewählt. Mittels spin-coating wurden daraus Filme mit einer mittleren Schichtdicke von 65 ± 3 nm hergestellt, durch einen Tauchprozess konnten Schichtdicken von 9 ± 2 nm erreicht werden.

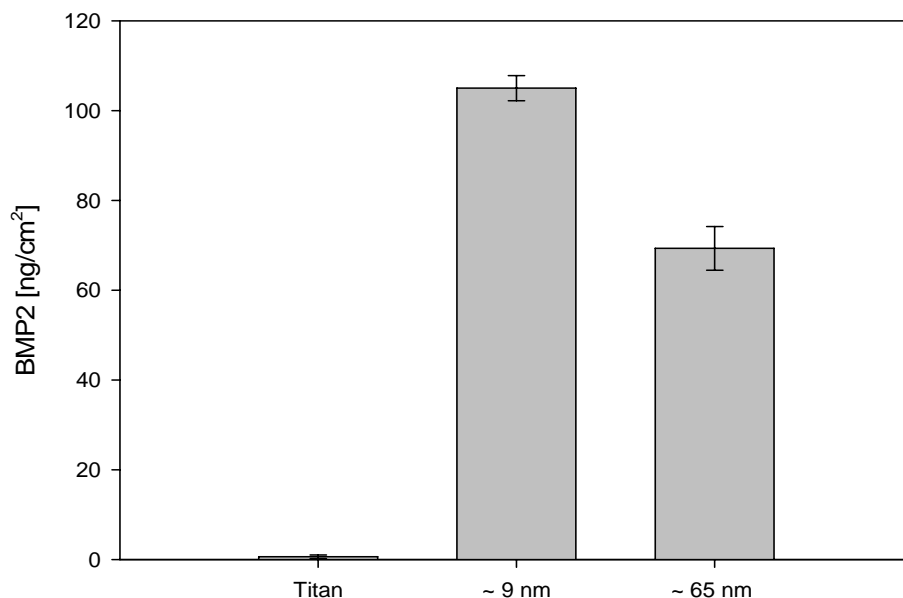


Abbildung 91: ELISA bei verschiedenen Schichtdicken von Poly-VBP-co-GMA (85 % GMA)

Die in Abbildung 91 dargestellten Resultate zeigen, dass ein Film mit einer Schichtdicke von 9 ± 2 nm in der Lage ist, 105 ± 3 ng/cm² BMP anzubinden. Das liegt in dem Bereich, den Shi an mit EDC aktiviertem Carboxymethylchitosan (146 ± 19 ng/cm²)^[82] und oxidiertem

Dextran (95 ng/cm^2)^[252] auf Titan erreichen konnte. Auf Grund der Vernetzung können aber auch Filme mit deutlich höheren Schichtdicken hergestellt werden, die demzufolge auch mehr mögliche Bindungsstellen für BMP2 besitzen sollten. Es zeigt sich jedoch, dass ein Film mit einer Schichtdicke von $65 \pm 3 \text{ nm}$ eine deutlich geringere Menge, $69 \pm 5 \text{ ng/cm}^2$, bindet. CULLEN hat für vernetzte Filme aus Poly(GMA-co-2-AOEMA) die Dichte der Epoxidgruppen mit Hilfe von Dodecylamin bestimmt und konnte einen Anstieg bei wachsender Schicht nachweisen.^[184] Die von ihm bestimmte angebundene Menge des Oligonucleotids ist auf verschiedenen Substraten eindeutig abhängig von der Schichtdicke, wobei die beobachtete Quellung des Polymers die Anzahl der mittels Diffusion erreichbaren Epoxidgruppen innerhalb des Filmes erhöht. Die Filme aus Poly-VBP-co-GMA verhalten sich in der Anbindung von BMP2 jedoch entgegengesetzt. Die Quellung ermöglicht höchstwahrscheinlich eine Diffusion des BMP2 in den Film hinein, jedoch konnte nicht überprüft werden, ob diese Quellung homogen ist oder vielleicht nur an der Grenzfläche zwischen Polymerfilm und Flüssigkeit besonders ausgeprägt ist. Auf diese Weise würde sich eine sterische Hinderung in der Zugänglichkeit der Epoxidgruppen mit ansteigender Schichtdicke erklären lassen. Ebenso sind aber auch Veränderungen in der Polarität möglich, die entweder die Diffusion des BMP2 oder der zur Detektion verwendeten Antikörper in den Film hinein erschweren. Diese könnten beispielsweise durch das Herstellungsverfahren verursacht werden, bedingt durch den Stress beim spin-coating könnten die Polymerknäule sich anders auf der Oberfläche anordnen als sie es während einer Tauchbeschichtung tun. Dies würde ebenfalls die Unterschiede in der angebondenen Menge BMP2 erklären. Bedingt durch die Bestimmung mit Hilfe von Antikörpern ist es jedoch nicht nur entscheidend, wie viel BMP2 angebonden werden kann, sondern auch ob das gebundene BMP2 für die Antikörper zugänglich ist. Kann das BMP2 nicht von den Antikörpern erreicht werden, ist es möglich, dass weniger BMP2 detektiert wird als tatsächlich angebonden ist und so das Ergebnis verfälscht wird.

Die Menge des immunologisch aktiven Proteins, die mit Hilfe des ELISAs bestimmt wird, sagt jedoch noch nichts darüber aus, wie viele Moleküle des Proteins tatsächlich noch biologisch aktiv und für die Zellen zugänglich sind. Besonders bei der kovalenten Immobilisierung ist die Gefahr, dass die Aktivität auf Grund von Konformations- oder Konfigurationsänderungen beeinträchtigt wird, hoch.^[158] Mit Hilfe eines Luciferase-Assays^[236] kann jedoch die biologische Aktivität des BMP2 bewiesen und quantifiziert werden. Bei diesem Test wurden ebenfalls verschiedene Schichtdicken eines Films auf Poly-

VBP-co-GMA mit 85 % GMA untersucht. Es zeigt sich, dass sowohl bei den dünnen (8 ± 3 nm) als auch bei den dickeren Schichten (28 ± 7 nm) nur ein sehr geringer Teil, etwa 9 %, des gebundenen BMP2s biologisch aktiv ist (siehe Abbildung 92).

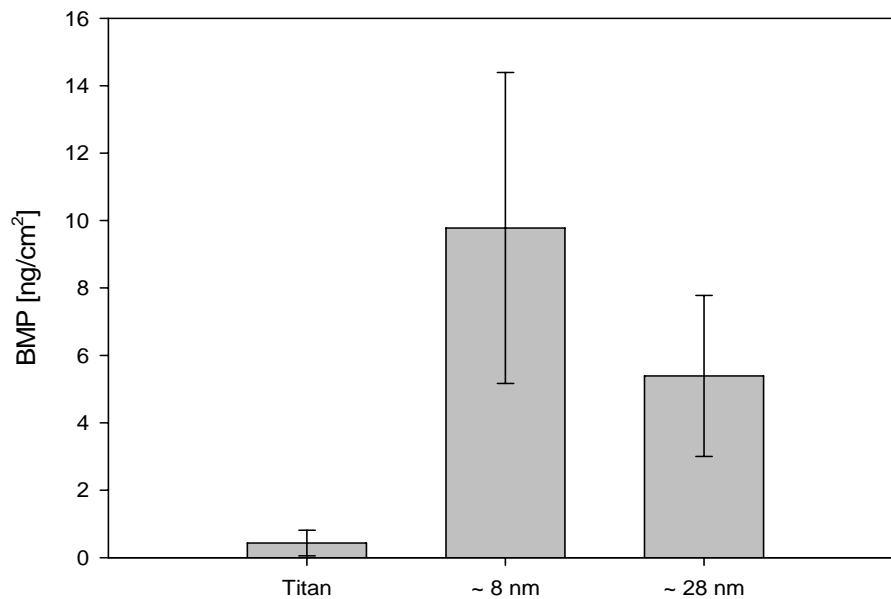


Abbildung 92: BREluc von Filmen aus Poly-VBP-co-GMA (85 %) mit verschiedenen Schichtdicken

Ein Grund dafür kann zum einen die verringerte Aktivität durch die kovalente Anbindung sein. Da bei dieser Copolymerzusammensetzung GMA-Blöcke von 5-8 Monomereinheiten auftreten können, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nebeneinander liegende Epoxidfunktionen mit dem BMP2 reagieren und es so zu einer Konformationsänderung kommt, die die Aktivität verringert. Eine weitere mögliche Erklärung kann aber auch eine schlechtere Zugänglichkeit sein. Wenn die Proteine in die Polymerschicht hineinwandern und dort gebunden werden, sind sie für die Antikörper aus dem ELISA noch erreichbar. Die Zellen hingegen, die im BREluc-Test verwendet werden, können nicht in die Polymerschicht hinein diffundieren und werden daher nur von den BMP2-Molekülen, die an der Oberfläche gebunden sind, zur Luciferase-Produktion angeregt.

Eine weitere mögliche Begründung für die geringe Menge an bioaktivem BMP2 wären die zu engen Abstände zwischen den einzelnen BMP2-Molekülen, so dass gar nicht alle von den Zellen erkannt werden können. Daher wurde eine weitere Zusammensetzung des Copolymers mit einem geringeren Anteil (66 %) an GMA getestet, welches auf Grund der geringeren Menge an Epoxidgruppen auch weniger BMP2 binden sollte. Das Ergebnis des ELISA in Abbildung 93 bestätigt diese Vermutung, statt 105 ± 3 ng/cm² bei einem Anteil von 85 % werden nun nur noch 60 ± 15 ng/cm² gebunden. Trotz des geringeren Anteils an GMA sowie einer geringeren Schichtdicke (23 ± 6 nm) wird das BMP2 hier in derselben Größenordnung

angebunden wie auf einem Film mit 85 % GMA und $65 \pm 3\text{nm}$. Dies bestätigt, dass die angebundene Menge des BMP2 von der Zusammensetzung des Copolymers abhängt, gleichzeitig aber auch die Schichtdicke einen bisher noch nicht geklärten Einfluss besitzt.

Der negative Wert, der sich bei diesem Test für das blanke Titan ergibt, ist folgendermaßen zu erklären: Ein Teil sowohl der beschichteten als auch der blanken Plättchen wird mit einer Lösung von BMP2 in MES-Puffer behandelt, der andere Teil zu Kontrollzwecken nur mit MES-Puffer. Anschließend wird auf allen Plättchen der ELISA mit den Antikörpern durchgeführt. Dabei kommt es auf den mit MES-Puffer behandelten Plättchen teilweise zu einer unspezifischen Adsorption der Antikörper. Die sich dabei ergebenden Werte der optischen Dichte werden als Hintergrund-Signal von der Absorption, die bei den Plättchen, die mit BMP2 behandelt wurden, abgezogen. In diesem Fall liegt nun eine hohe unspezifische Adsorption bei den Plättchen mit MES-Puffer vor, so dass der berechnete Wert für das angebundene BMP2 negativ ist. Da dies keinen Sinn ergibt, bedeutet es lediglich, dass kein BMP2 an das unbehandelte Titan bindet.

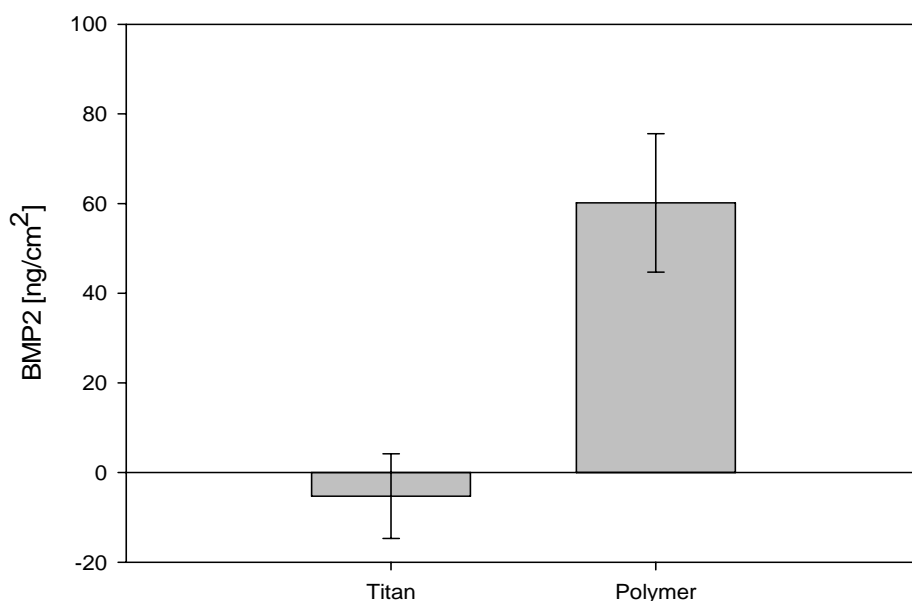


Abbildung 93: ELISA eines Films aus Poly-VBP-co-GMA mit 66 % GMA, Schichtdicke $23 \pm 6\text{ nm}$

Auch bei dieser Copolymerzusammensetzung mit einem Anteil von 66 % GMA wurde anschließend ein BRELUC-Test durchgeführt, um die Menge an biologisch aktivem BMP2 zu quantifizieren (vgl. Abbildung 94). Dabei zeigt sich, dass in diesem Fall ebenfalls nur ein geringer Teil (ca. 14 %) biologisch aktiv ist. Verwunderlich ist hierbei aber die Menge an BMP2, die auf dem unbehandelten Titan bestimmt wird. Während aus dem ELISA resultiert, dass gar kein BMP2 auf der Oberfläche vorhanden ist, wird beim BRELUC biologisch aktives BMP2 detektiert. Vermutlich handelt es sich hier um eine unspezifische Adsorption von

BMP2, die auch schon bei dem BRELUC-Test auf mit Poly-VBP-co-HEMA beschichteten Plättchen (vgl. Abbildung 62) beobachtet werden konnte.

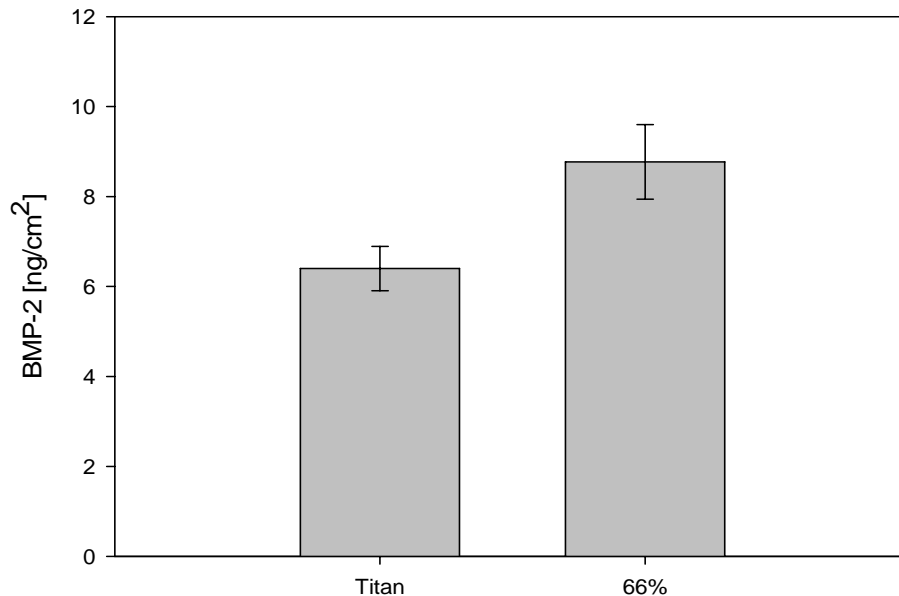


Abbildung 94: BRELUC eines Films aus Poly-VBP-co-GMA mit 66 % GMA, Schichtdicke 23 ± 6 nm

ZEMANOVÁ konnte zeigen, dass die Menge an Protein, die an einen epoxidhaltigen Träger gebunden wird, nicht nur vom Protein selbst und dem Träger abhängt, sondern auch vom pH-Wert des Reaktionsmediums.^[253] Zusätzlich zu dem bisher verwendeten MES-Puffer mit einem pH-Wert von 5 wurde die Anbindung von BMP2 auf mit Poly-VBP-co-GMA beschichteten Plättchen daher auch in MOPS-Puffer bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt. Die Resultate sind in Abbildung 95 dargestellt.

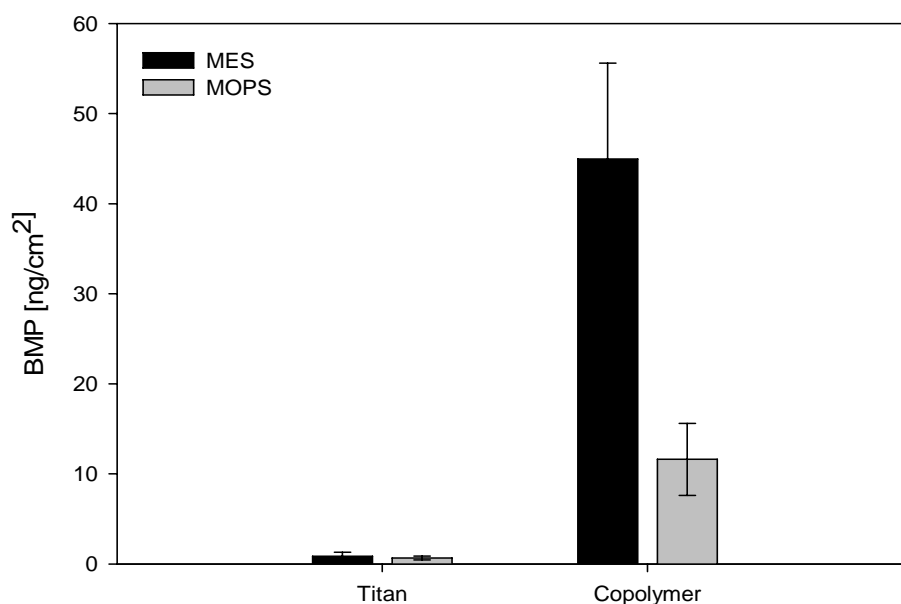


Abbildung 95: ELISA für Poly-VBP-co-GMA (16 % VBP, Schichtdicke 53 ± 5 nm) in MES- und MOPS-Puffer

Durch die Verwendung von Puffern unterschiedlicher pH-Werte konnte die Abhängigkeit der angebundenen BMP2-Menge vom pH-Wert bestätigt werden, jedoch verringert sich die Menge an gebundenem BMP2 von 45 ng/cm² auf 11 ng/cm².

Der BREluc-Test wurde ebenfalls erneut in beiden Puffern durchgeführt. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass bei der durchgeführten Sterilfiltration das BMP2 aus dem MOPS-Puffer entfernt wird und daher im BREluc-Test nicht nachgewiesen werden konnte. Normalerweise sind Proteine auf Grund ihrer Größe in der Lage, den Filter zu passieren. Da dies nicht mehr möglich ist, deutet dies auf eine Denaturierung oder Inaktivierung des BMP2 im MOPS-Puffer hin, die mit einer Größenzunahme einhergeht. Daher sind in Abbildung 96 nur die in diesem Versuch erhaltenen Ergebnisse in MES-Puffer dargestellt.

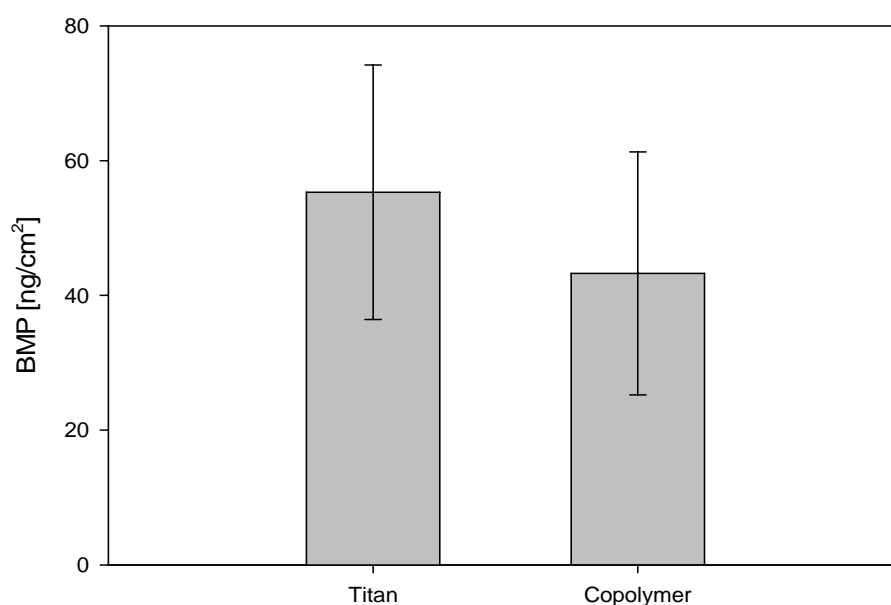


Abbildung 96: BREluc für Poly-VBP-co-GMA (16 % VBP, 53 ± 5 nm)

Die aus der Luziferase-Aktivität bestimmte Menge an BMP2 beträgt für das unbehandelte Titan 55 ng/cm² und auf dem Copolymer 43 ng/cm². Auf Grund der ungewöhnlich großen Menge an BMP2, die auf Titan nachgewiesen werden konnte, wird jedoch die Aussagekraft der auf dem Copolymer bestimmten Menge angezweifelt. Wenn bereits eine so große Menge auf dem unbehandelten Titan adsorbiert wird, ist es ebenfalls möglich, dass das auf dem Copolymer nachgewiesene BMP2 nicht nur kovalent gebunden ist, sondern ein Teil davon auch adsorbiert ist.

Die *in-vitro*-Untersuchungen zeigen, dass Beschichtungen aus Poly-VBP-co-GMA in der Lage sind, bis zu 105 ng/cm² BMP2 zu binden und somit deutlich größere Mengen

immobilisieren können als phosphonatbasierte Monoschichten oder Poly-VBP-co-NASI.^[254] Davon ist jedoch nur ein geringer Anteil von ca. 10 % biologisch aktiv. Ob dies für einen positiven oder signifikanten Effekt in der Osseointegration ausreicht, wird in den nachfolgenden *in-vivo*-Versuchen überprüft.

9.3 *In-vivo*-Untersuchungen

Die *in-vivo*-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Hoffmann vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung und Priv.-Doz. Dr. med. Fritz Thorey von der Orthopädischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des Experiments und der erhaltenen Resultate ist in der entsprechenden Veröffentlichung^[255] nachzulesen. Kurz zusammengefasst wurden 32 Zylinder aus Ti6Al4V und einer Größe von 3x3 mm in vier Gruppen aufgeteilt und jeweils ein Implantat jeder Gruppe in die Femurkondyle von New Zealand White Rabbits implantiert. Dabei bestand die erste Gruppe aus einer unbeschichteten Kontrolle und die zweite aus einer mittels dip-coating hergestellten Schicht aus Poly-VBP-co-GMA, die anschließend mit BMP2 modifiziert wurde. In der dritten Gruppe wurde eine Lösung von BMP2 in wässrigem Puffer auf die Zylinder getropft und über Nacht antrocknen gelassen, während in der vierten Gruppe zusätzlich TGF- β 2 zu der Lösung hinzu gegeben wurde. Vier Wochen nach der Implantation wurden die Tiere euthanisiert und die Integration der Implantate mit Hilfe eines μ -Computer-Tomographs untersucht. Nach der Auswertung mit einem Computerprogramm wird der Quotient aus Knochenvolumen und totalem Volumen (BV/TV) als Maß für die Integration des Kontroll-Zylinders auf 100 % gesetzt und die Resultate der beschichteten Zylinder damit verglichen. Wie in Abbildung 97 dargestellt, zeigen die Zylinder, die mit dem Copolymer und BMP2 beschichtet wurden, eine Verbesserung der Integration im Vergleich zu der Kontrolle, jedoch ist diese nicht signifikant. Eine deutlich bessere Integration wird bei den Zylindern erreicht, auf denen das BMP2 beziehungsweise BMP2 und TGF- β 2 lediglich adsorbiert ist. Ursache für diese nur sehr geringe Verbesserung der Integration der Zylinder mit kovalent gebundenem BMP2 ist sehr wahrscheinlich die geringe Menge des Wachstumsproteins. Die adsorbierte Menge liegt im μ g-Bereich, die kovalent gebundene Menge vermutlich hingegen nur in der Größenordnung von ng.

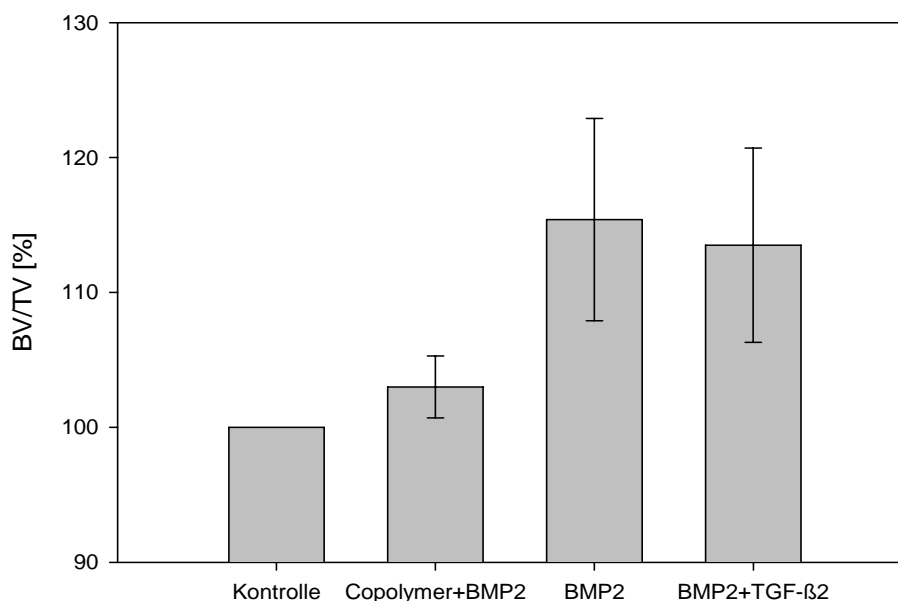


Abbildung 97: Osseointegration der implantierten Zylinder^[255]

9.4 Umsetzung mit einem Amin und Nachweis

JENNISEN immobilisiert BMP2 oder Ubiquitin als Modellprotein auf Titanimplantaten, indem er das Titan zunächst mit Chromschwefelsäure oxidiert und anschließend einen Aminopropyltriethoxysilan-Anker anbindet, der dann mit CDI aktiviert wird. Dabei zeigte sich, dass auch auf dem nicht aktivierten Anker eine deutliche Menge Ubiquitin, das heißt 900-1060 ng/cm², nachgewiesen werden konnte.^[65] Da es sich nur unter drastischen Bedingungen (0,1 M NaOH/1 % SDS bei 60 °C) entfernen lässt, wurden weitere Untersuchungen zur Art Wechselwirkung durchgeführt. JENNISEN postulierte, dass es sich dabei um eine hydrophobe Adsorption des Proteins an den Propylrest handelt.^[65] Sowohl die unpolaren Gruppen des Ankers als auch die hydrophoben Teile des Proteins sind von einer monomolekularen Wasserschicht umgeben. Bei einem Kontakt der beiden wird diese zerstört und die Freie Energie der Wechselwirkung resultiert somit aus einem Gewinn an Entropie.^[256] Die Adsorption von BMP2 an verschiedene Ankermoleküle wie zum Beispiel Trichlorpropylsilan und Trichlorhexylsilan wurde ebenfalls untersucht, dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge sowohl von dem Ankermolekül als auch von der Vorbehandlung des Titans abhängig ist.^[65, 256] Ausgewählte Daten befinden sich in Tabelle 9.

Tabelle 9: Nicht-kovalente Immobilisierung von rhBMP2 an verschiedene Silan-Anker^[256]

<i>Immobilisiertes Silan</i>	<i>Elektropoliertes Titan [ng/cm²]</i>	<i>Chromschwefelsäure geätztes Titan [ng/cm²]</i>
Titan (unspez. Adsorption)	29 ± 4	2 ± 2
Aminopropyltriethoxysilan	21 ± 2	105 ± 14
Trichlorpropylsilan	71 ± 5	121 ± 25
Trichlorhexylsilan	81 ± 8	218 ± 16

EHLERT et al. konnten mit alkalischer Phosphatase (ALP) als Modellprotein ebenfalls zeigen, dass Aminopropyltrimethoxysilan-modifizierte Glasoberflächen in der Lage sind, Proteine zu binden. Die Menge an nativer ALP variiert mit der Dichte der verwendeten Anker-moleküle zwischen 36 und 53 ng/cm².^[257] Für BMP2 konnte auf mit Aminopropyltrimethoxysilan beschichtetem Glas nur 5 ng/cm² mit Hilfe des ELISAs bestimmt werden. Durch eine vorangehende Vergrößerung der Oberfläche durch eine Beschichtung mit einer unstrukturierten oder nanoporösen Silika-Schicht konnte die Menge an immobilisiertem BMP2 aber auf 13-15 ng/cm² erhöht werden, von denen jedoch nur 2 beziehungsweise 5 ng/cm² biologisch aktiv sind.^[258] Für die Art der Bindung schlagen EHLERT et al. elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Aminogruppe und dem BMP2 vor.^[258] Bei dem für die Kopplung verwendeten pH-Wert von 5 sind die Aminogruppen teilweise protoniert und können mit negativ geladenen oder polarisierten Teilen des BMP2s wechselwirken.^[258]

Basierend auf den Arbeiten von EHLERT et al. wurde zunächst angenommen, dass die Aminogruppe entscheidend für die Immobilisierung des BMP2 ist. Da die Epoxid-Funktion für vielfältige Modifikationen geeignet ist, wurden daraufhin Filme aus Poly-VBP-co-GMA mit Ethylendiamin umgesetzt. In Anlehnung an die Kopplung des Proteins wurde dies zunächst über Nacht bei geringerer Temperatur (10 °C) durchgeführt. Dabei konnten aber keine signifikanten Änderungen beobachtet werden, so dass die Reaktion bei Raumtemperatur wiederholt wurde, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen. Die Kontaktwinkel sanken daraufhin deutlich um etwa 25°, was sich aber nicht in allen weiteren Versuchsreihen reproduzieren ließ. Daher wurde eine detaillierte Untersuchung mittels XPS durchgeführt. Abbildung 98 zeigt die Anteile der Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Phosphor und Stickstoff, die aus den Übersichtsspektren der mit Copolymer beschichteten Plättchen sowie

denen, die bei Raumtemperatur und 10 °C mit Amin behandelten Plättchen ermittelt wurden. Zum Vergleich sind ebenfalls die berechneten theoretischen Erwartungswerte aufgetragen.

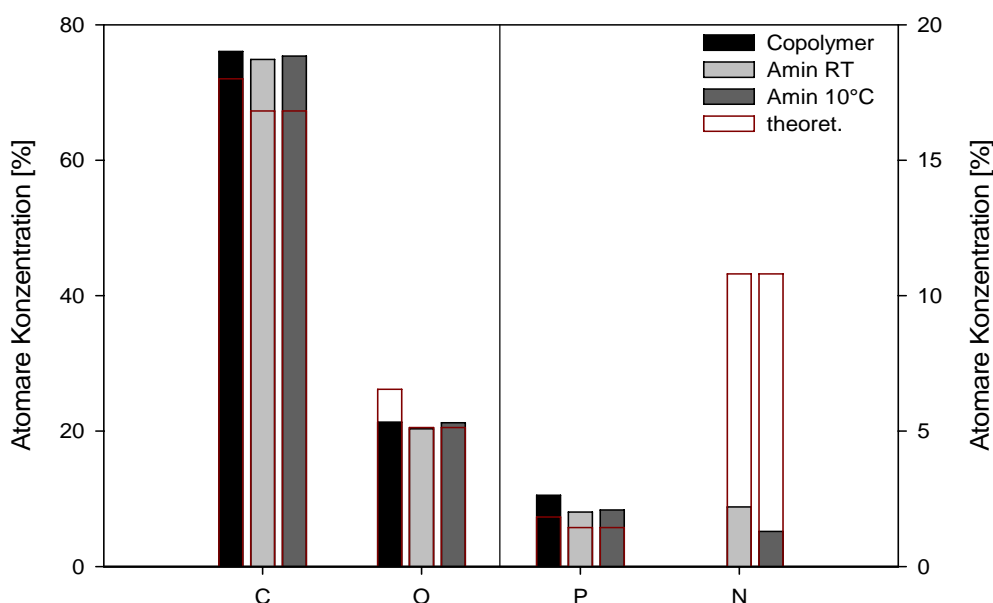


Abbildung 98: Übersichtsspektrum der Plättchen mit unbehandeltem Copolymer sowie denen, die bei Raumtemperatur (RT) und 10 °C mit Ethylendiamin behandelt wurden, im Vergleich mit den theoretischen Erwartungswerten

Bei den experimentell ermittelten Konzentrationen von Kohlenstoff und Phosphor ist bei der Umsetzung mit Ethylendiamin eine Abnahme zu erkennen, die mit der Tendenz der theoretisch berechneten Werte übereinstimmt. Für Sauerstoff wird ebenfalls eine Abnahme der Konzentration erwartet, tatsächlich ist jedoch keine Veränderung sichtbar, da der Anteil an Sauerstoff bei dem unbehandelten Copolymer geringer ist als der Erwartungswert. Einen deutlichen Unterschied zu dem unbehandelten Copolymer gibt es bei der Konzentration des Stickstoffs. Nach der Umsetzung mit dem Ethylendiamin können nun 2,2 beziehungsweise 1,3 % Stickstoff auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Dieser Anteil liegt jedoch deutlich unter dem theoretisch berechneten Wert von 10,8 %, so dass sich bei der Umsetzung mit Ethylendiamin bei Raumtemperatur ein Umsatz von 20 % und bei 10 °C ein Umsatz von 12 % ergibt. Dies bestätigen auch die Veränderungen der anderen Elemente, die zwar recht gering ausfallen, aber in der erwarteten Tendenz stattfinden. Weitere Rückschlüsse auf die Umsetzung mit Ethylendiamin können aus der Betrachtung der hochaufgelösten Kohlenstoff-Spektren (Abbildung 99) gezogen werden. Zunächst einmal ist festzuhalten, dass die für das unbehandelte Copolymer ermittelten Konzentrationen der einzelnen Kohlenstoffe gut mit den theoretisch berechneten Werten übereinstimmen. C₁ steht dabei für den Kohlenstoff bei 285 eV, C₂ entspricht dem Kohlenstoff mit einer Bindungsenergie von ungefähr 286,5 eV, der

an Sauerstoff oder Stickstoff gebunden ist und C₃ (289 eV) dem Carbonylkohlenstoff der Methacrylateinheit. Bei einer Umsetzung mit Ethylendiamin werden zusätzlich zwei C₂-Kohlenstoffe in das Copolymer eingebaut, so dass deren Anteil steigt und der prozentuale Anteil an C₁ und C₃ absinkt. Diese Tendenz ist nur in sehr geringer Ausprägung zu beobachten und auch nur dann, wenn als Referenz die experimentell ermittelten Werte des unbehandelten Copolymers anstatt der theoretischen Erwartungswerte betrachtet werden.

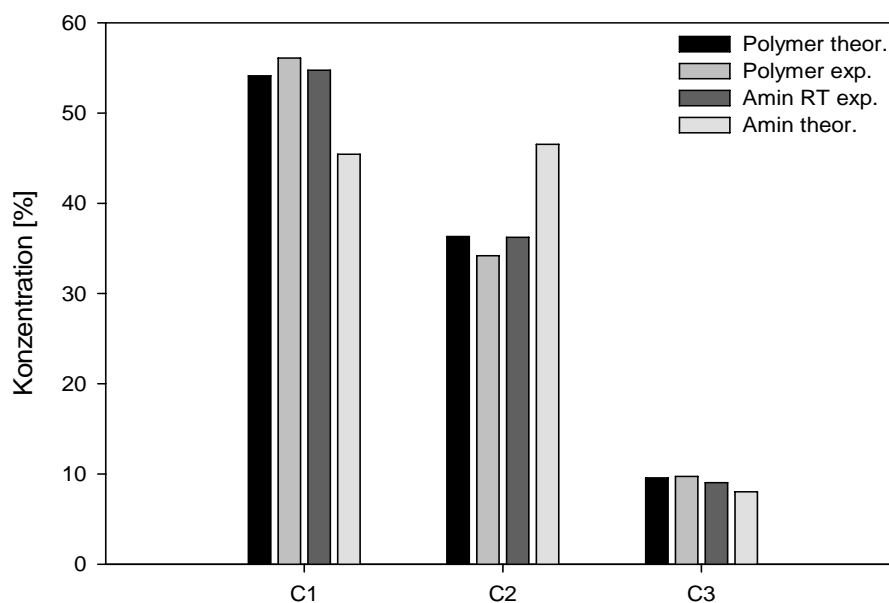


Abbildung 99: Konzentrationen der Kohlenstoffe auf den Plättchen mit unbehandeltem und bei Raumtemperatur mit Ethylendiamin behandeltem Copolymer

Werden die erwarteten Konzentrationen jedoch nicht für einen vollständigen Umsatz mit Ethylendiamin berechnet, sondern mit der aus dem Stickstoff-Anteil berechneten Ausbeute von 20 %, ist die Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Werten besser (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Konzentrationen der Kohlenstoffe bei mit Ethylendiamin umgesetzten Copolymeren und theoretisch berechnete Werte für unterschiedliche Ausbeuten

<i>Kohlenstoff</i>	<i>Amin experimentell</i>	<i>Amin theoret. bei 100 % Umsatz</i>	<i>Amin theoret. bei 20 % Umsatz</i>
C ₁	54,74 %	45,43 %	54,84 %
C ₂	36,22 %	46,45 %	35,9 %
C ₃	9,04 %	8,03 %	9,25 %

Bei den bisherigen Untersuchungen hatte die Erhöhung der Reaktionstemperatur einen Anstieg des Umsatzes zur Folge, so dass im Folgenden überprüft wurde, ob bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C eine höhere Ausbeute als bisher erzielt werden kann. Abbildung 100 zeigt die Konzentration der Elemente, wie sie aus den Übersichtsspektren erhalten wurden. Trotz der unterschiedlichen Reaktionstemperaturen ist bei Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor kein großer Unterschied in den Anteilen erkennbar. Einzig der Anteil an Stickstoff ist insgesamt etwas höher, jedoch liegt die für die Umsetzung bei Raumtemperatur berechnete Ausbeute mit 28 % etwas höher als die bei 37 °C mit 20 %, so dass die Erhöhung der Temperatur in diesem Fall keine Verbesserung des Umsatzes bewirken konnte.

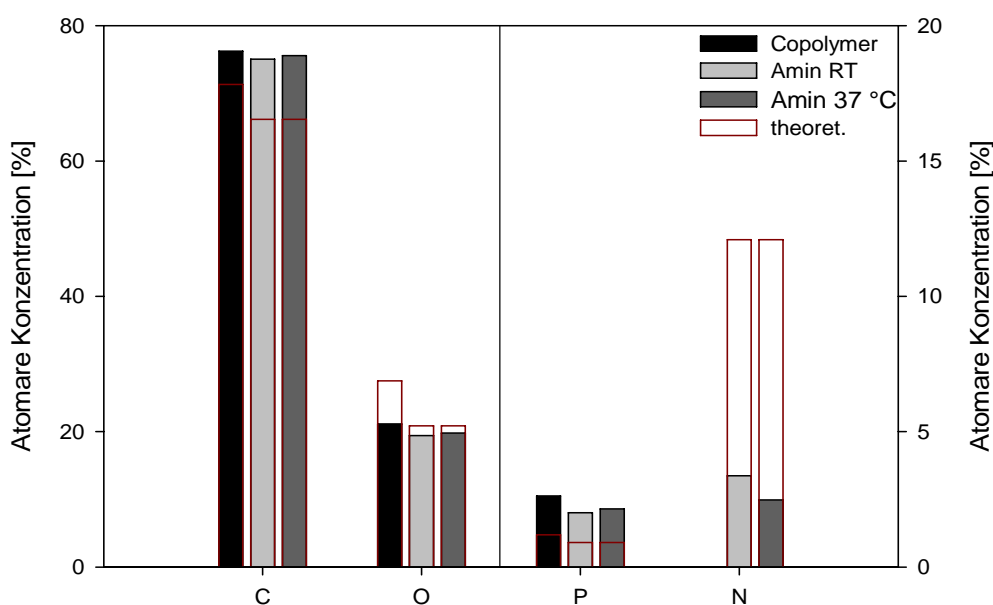


Abbildung 100: Atomare Konzentration der Elemente C, O, P und N auf mit Copolymer beschichteten und bei Raumtemperatur (RT) und 37 °C mit Ethylendiamin behandelten Plättchen

Daher wurde sowohl der ELISA als auch der BRELUC-Test nur mit den Plättchen durchgeführt, die bei Raumtemperatur und 10 °C mit Ethylendiamin umgesetzt wurden, um zu überprüfen, welchen Einfluss das angebundene Ethylendiamin auf die Anbindung des BMP2 besitzt. Abbildung 101 zeigt, dass die mit Hilfe des ELISAs nachgewiesene Menge an BMP2 auf den mit Ethylendiamin behandelten Plättchen deutlich geringer ist als die auf den reinen Copolymerplättchen (je nach Schichtdicke 70 beziehungsweise 105 ng/cm²). Begründung für diese geringen Mengen an BMP2 könnte die nur sehr geringe Umsetzung mit Ethylendiamin von ungefähr 20 % sein, so dass nicht ausreichend Wechselwirkungen ausgebildet werden konnten. Wahrscheinlicher scheint jedoch, dass das Ethylendiamin durch die Reaktion mit dem Epoxid mögliche Bindungsstellen blockt und das BMP2 nur mit den

verbleibenden freien Epoxiden reagieren kann, so dass die angebundene Menge deutlich geringer ist als bei den unbehandelten Copolymeren.

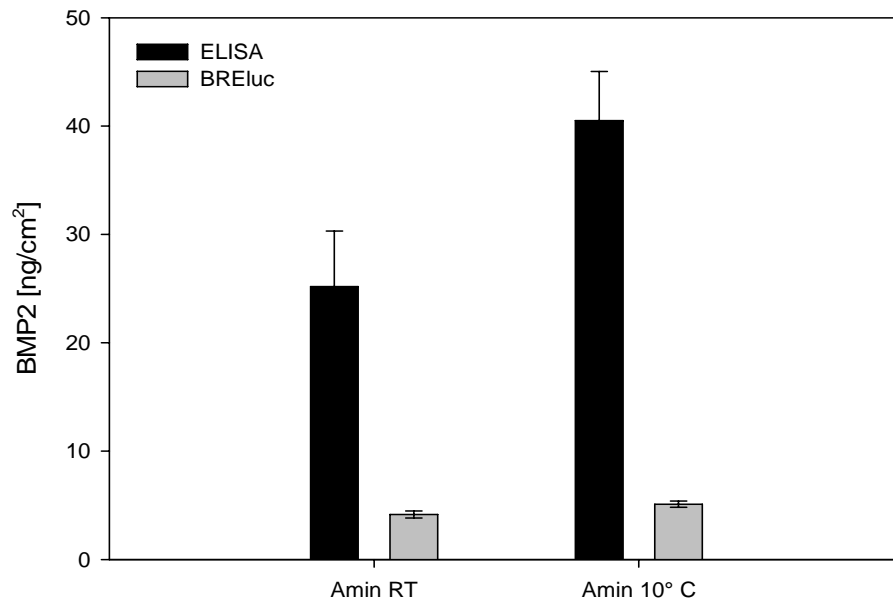


Abbildung 101: Mittels ELISA und BRELuc bestimmte BMP2-Menge auf mit Ethylendiamin behandelten Copolymerplättchen

Beim Vergleich der Ergebnisse des ELISA und BRELuc-Tests zeigt sich wie in allen bisherigen Untersuchungen eine deutliche Differenz zwischen der immunologisch und der biologisch aktiven Menge an BMP2. Auf den bei Raumtemperatur mit Ethylendiamin behandelten Copolymerplättchen werden im BRELuc-Test $4,1 \pm 0,3$ ng/cm² als biologisch aktiv nachgewiesen, das entspricht etwa 16 % der mittels ELISA bestimmten Menge an angebundenem BMP2, bei den bei 10 °C mit Ethylendiamin behandelten Plättchen sind es sogar nur 13 %. EHLERT et al. konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls eine starke Differenz zwischen der Menge an BMP2, die mit Hilfe des ELISAs und der, die mittels BRELuc-Test bestimmt wurde, nachweisen.^[258] Da es sich bei dem BRELuc-Test um einen sehr sensitiven und spezifischen Test handelt, dessen Nachweisgrenze bei 1 ng liegt, ist der damit erhaltene Wert als aussagekräftiger zu erachten. Dies erklärt außerdem die Differenz gegenüber den Mengen, die JENNISSEN in seinen Untersuchungen erhält.^[65] Dort wird radioaktiv markiertes BMP2 verwendet und bei der Detektion nicht zwischen inaktivem, immunologisch oder biologisch aktivem BMP2 unterschieden, so dass die Gesamtmenge an angebundenem BMP2 bestimmt wird, aber keine Aussage darüber möglich ist, ob das Protein noch aktiv ist.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass durch die Umsetzung der Epoxidgruppe mit Ethylendiamin keine Verbesserung der Anbindung von BMP2 erzielt werden konnte. Die

Differenz zu den von JENNISSEN erhaltenen Werte könnte wie oben erläutert auf die Nachweismethode für das BMP2 zurückzuführen sein, so dass in seinen Untersuchungen zwar BMP2 immobilisiert wird, dieses jedoch nicht biologisch aktiv ist. Weiterhin bleibt unklar, ob eine Wechselwirkung zwischen der Aminogruppe und dem BMP2 vorliegt, da mit den durchgeführten Tests nicht nachgewiesen werden kann, an welche funktionelle Gruppe das BMP2 gebunden ist. Eine mögliche Begründung für die vorliegenden Resultate wäre jedoch die Blockierung der Epoxidgruppen durch das Ethylendiamin, so dass weniger zur Anbindung des BMP2 zur Verfügung stehen. Basierend auf der von JENNISSEN postulierten hydrophoben Adsorption zwischen dem Alkylrest und BMP2 scheint es weiterhin unwahrscheinlich, dass die Aminoethylfunktion zur Anbindung des BMP2 beiträgt, da der Effekt erst bei längeren Alkylketten stärker ausgeprägt ist.

10 Zusammenfassung

Auf Grund der steigenden Lebenserwartung ist für die nächsten Jahrzehnte ein deutlicher Anstieg bei der Zahl der Implantationen von künstlichen Hüftgelenken zu erwarten. Deren Lebensdauer ist jedoch im Allgemeinen durch das Auftreten einer aseptischen Prothesenlockerung begrenzt. Das stetig wachsende Verständnis der Vorgänge im menschlichen Körper hat zur Folge, dass immer häufiger Proteine als Medikamente eingesetzt werden können. Ein Beispiel ist der körpereigene Wachstumsfaktor BMP2, welcher an der Knochenbildung und Regeneration beteiligt ist. Forschungen zur Applikation von BMP2 in der Implantationsmedizin haben bereits vielversprechende Ergebnisse hervorgebracht. Zur Verbesserung der Osseointegration von Hüftendoprothesen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine polymere Zwischenschicht entwickelt, an die kovalent der Wachstumsfaktor BMP2 gebunden wird. Die Verwendung von Copolymeren als Zwischenschicht ermöglicht dabei die Kombination von verschiedenen funktionellen Gruppen ohne aufwändige Syntheseschritte, zusätzlich können weitere Eigenschaften wie beispielsweise die Hydrophilie über die Anteile der jeweiligen Monomere eingestellt werden. Insbesondere die funktionelle Gruppe zur kovalenten Anbindung des BMP2s kann auf diesem Weg sehr einfach variiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu eine Aldehydfunktion, ein Epoxid sowie eine Imidazol-aktivierte Hydroxygruppe eingesetzt. Zur Immobilisierung auf der Titanoberfläche wird auf Grund seiner guten Biokompatibilität hauptsächlich Vinylbenzylphosphonat verwendet, zur Untersuchung des Einflusses der Hydrophilie der Anbindungsgruppe wird zusätzlich noch Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat eingesetzt. Daraus ergeben sich die Copolymere Poly(vinylbenzylphosphonat-co-diethoxyethylmethacrylat), Poly(vinylbenzylphosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat), Poly(dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat) sowie Poly(vinylbenzylphosphonat-co-glycidylmethacrylat), welche im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und deren Schichten auf Titansubstraten mit diversen analytischen Methoden untersucht wurden.

Aus Poly(vinylbenzylphosphonat-co-diethoxyethylmethacrylat) können mittels spin-coating Filme mit Schichtdicken von wenigen Nanometern hergestellt werden, deren Kontaktwinkel über einen breiten Zusammensetzungsbereich recht ähnlich sind. Da die Aldehydfunktion zur Copolymerisation als Acetal eingesetzt wurde, ist vor der Anbindung des BMP2 eine Entfernung der Schutzgruppe erforderlich. Die Umsetzungen auf der Oberfläche wurden dabei mittels Photoelektronenspektroskopie verfolgt. Unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen konnten dabei jedoch keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Im

Vergleich dazu konnten die Hydroxygruppen von Poly(vinylbenzylphosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat) erfolgreich mit Carbonyldiimidazol aktiviert werden. Daher wurden die wenige Nanometer dicken Filme mit BMP2 inkubiert und mit Hilfe eines ELISA und BRELUC-Testes die angebundene Menge quantifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die immobilisierte Menge von $114 \pm 20 \text{ ng/cm}^2$ die bisherigen Resultate deutlich überstieg, davon jedoch nur ein geringer Teil, das heißt etwa 10 %, biologisch aktiv ist. Eine Veränderung der Hydrophilie durch die Verwendung von Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat statt des Vinylbenzylphosphonats zeigte sich deutlich in den geringeren Kontaktwinkeln, wirkte sich jedoch bereits auf die Aktivierung mit CDI negativ aus, so dass keine Anbindung von BMP2 durchgeführt wurde. Poly(vinylbenzylphosphonat-co-glycidylmethacrylat) nimmt in der Ausbildung der Filme eine Sonderposition ein, da die Schichtdicke vermutlich auf Grund von Vernetzungsvorgängen das bis zu 10fache der anderen Copolymere erreichen kann. Obwohl mit einer höheren Schichtdicke auch ein vermehrtes Vorhandensein der Epoxidfunktion einhergeht, konnte auf einer dickeren Schicht weniger BMP2 gebunden werden als auf einer sehr dünnen, welche mit $105 \pm 3 \text{ ng/cm}^2$ BMP2 in derselben Größenordnung wie Poly(vinylbenzylphosphonat-co-hydroxyethylmethacrylat) anbinden kann. Die durchgeführten *in-vivo*-Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse aus dem BRELUC-Test. Da wiederum nur ein geringer Teil des BMP2 von etwa 9 % biologisch aktiv ist, wird im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle nur eine geringe Verbesserung des Knochen-Implantat-Kontaktes erreicht. Zusammenfassend ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen, mehrere Copolymere zu entwickeln, die in der Lage sind, an Titan zu binden und damit eine einfache Synthesestrategie für Beschichtungen für medizinische Fragestellungen aufzuzeigen. Zwei der gewählten Copolymere sind außerdem in der Lage, BMP2 in großen Mengen zu immobilisieren. Als problematisch hat sich dabei jedoch die Erhaltung der Bioaktivität erwiesen, diese Herausforderung gilt es in weiteren Untersuchungen zu meistern. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass durch eine kovalente Anbindung die biologische Aktivität erhalten bleibt, scheint es sich dabei eher um Problem der Zugänglichkeit des BMP2 für die Zellen zu handeln. Dieses könnte mit Hilfe des bereits in dieser Arbeit angedachten Spacers gelöst werden, so dass das BMP2 stärker aus der Polymerschicht herausragt und besser von den Rezeptoren erkannt wird. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines Release-Systems, bei dem auf eine kovalente Immobilisierung verzichtet wird und der Wachstumsfaktor stattdessen beispielsweise in ein auf der Implantatoberfläche gebundenes Hydrogel eingelagert wird. Die über verschiedene Einflussgrößen einstellbare Freisetzung erfolgt dann durch Quellung und/oder Degradation.

Neben BMP2 könnten außerdem weitere Proteine, beispielsweise antiinflammatorische oder angiogene Faktoren, angebunden werden, um durch eine synergistische Wirkung die Osseointegration des Implantates zu verbessern und so dessen Lebensdauer zu verlängern.

11 Experimenteller Teil

11.1 Materialien

11.1.1 Lösungsmittel

Tabelle 11: Eingesetzte Lösungsmittel

<i>Lösungsmittel</i>	<i>Qualität</i>
Aceton	technisch
Aceton	HPLC
Dichlormethan	technisch
Dichlormethan	HPLC
Dimethylformamid	HPLC
Dioxan	extra trocken
Methanol	technisch
Methanol	HPLC
Ethylacetat	technisch
Tetrahydrofuran	technisch
Tetrahydrofuran	HPLC
Petrolether	technisch
Diethylether	technisch
Wasser	Millipore

Die technischen Lösungsmittel wurden vor der Verwendung destilliert. Das Tetrahydrofuran in HPLC-Qualität wurde zusätzlich in der SPS-Anlage getrocknet. Dimethylformamid wurde über Natrium getrocknet und anschließend destilliert.

11.1.2 Chemikalien

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien mit Hersteller und Reinheitsgrad

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Reinheitsgrad</i>
2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (AIBN)	Acros	98 %
Natriumiodid	Fluka	≥ 99 %
Natriumhydrid	Acros Organics	80 % in grease

Harnstoff	Fluka	≥ 99 %
Hydroxyethylmethacrylat	Fluka	≥ 97 %
Chlortrimethylsilan	Acros Organics	98 %
Diethylphosphit	Fluka	≥ 90 %
Triethylamin	Acros Organics	99 %
Vinylbenzylchlorid	Aldrich	90 %
Dimethyl-2-hydroxyethylphosphonat	Acros Organics	95 %
2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol	Sigma Aldrich	99 %
Methacrylsäurechlorid	Alfa Aesar	97 %
Salzsäure (konzentriert)	Sigma Aldrich	37%
Calciumhydrid	Aldrich	90-95 %
Glycidylmethacrylat	Aldrich	97 %
Kaliumhydroxid	Sigma Aldrich	90 %
Methacrylsäure	Fluka	≥ 98 %
2-Brom-1,1-diethoxyethan	Aldrich	97 %
Tetramethylammoniumiodid	Aldrich	99 %
4-Methoxyphenol	Acros	99 %

Vinylbenzylchlorid wird vor der Verwendung über Calciumhydrid getrocknet und nach der Destillation unter Stickstoff gelagert. Triethylamin wird 17 h über Calciumhydrid refluxiert und anschließend abdestilliert.

11.2 Geräte und Methoden

11.2.1 NMR

Die Messung der ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren wurde im NMR-Labor der Chemischen Institute der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Die Spektren wurden an Geräten der Firma Bruker, Typ AV300 und AVIII400, mit 300 bzw. 400 MHz und einer Magnetfeldstärke von 9,4 T aufgenommen. Als interner Standard wird Tetramethylsilan eingesetzt. Zur Herstellung der Proben wurden ca. 20 mg Substanz in 0,7 mL Lösungsmittel gelöst, die Angaben zum verwendeten deuterierten Lösungsmittel finden sich bei der jeweiligen Synthese.

Bei einigen Copolymeren wurden die ^1H -NMR-Spektren zur Bestimmung der Zusammensetzung verwendet. Hierbei ist der Peak der aromatischen Protonen von Vinylbenzylphosphonat charakteristisch und deutlich von allen anderen separiert. Das

Integral I_1 wird auf die Anzahl der entsprechenden Protonen (4) gesetzt. Bei Poly-VBP-co-GMA gehen die weiteren Peaks ineinander über, so dass ein Integral I_2 über alle weiteren Peaks gelegt wird, dabei wird das Signal des zur Kalibrierung hinzugesetzten Tetramethylsilans nicht berücksichtigt. Die Anteile der Monomere im Copolymer lassen sich nun über folgende Formeln berechnen:

$$x(VBP) = \frac{10}{I_2 - 5} \quad y(GMA) = \frac{I_2 - 15}{I_2 - 5}$$

Bei Poly-VBP-co-HEMA wird ebenfalls das Integral I_1 der aromatischen Protonen auf 4 gesetzt. Ein weiteres Integral I_2 umfasst alle anderen Protonen bis auf die der Trimethylsilylschutzgruppe. Die Anteile der Monomere können nun wie folgt berechnet werden:

$$x(VBP) = \frac{9}{I_2 - 6} \quad y(HEMA) = \frac{I_2 - 15}{I_2 - 6}$$

Für Poly-VBP-co-DEEMA wird das erste Integral I_1 analog zu den bisherigen Copolymersystemen gewählt, das zweite I_2 umfasst jedoch nur den Teil der weiteren Peaks, dem die Methylengruppen der beiden Monomere sowie das Proton am tertiären Kohlenstoff des Acetals zugeordnet werden können. Abbildung 102 zeigt das Spektrum mit den entsprechenden Zuordnungen.

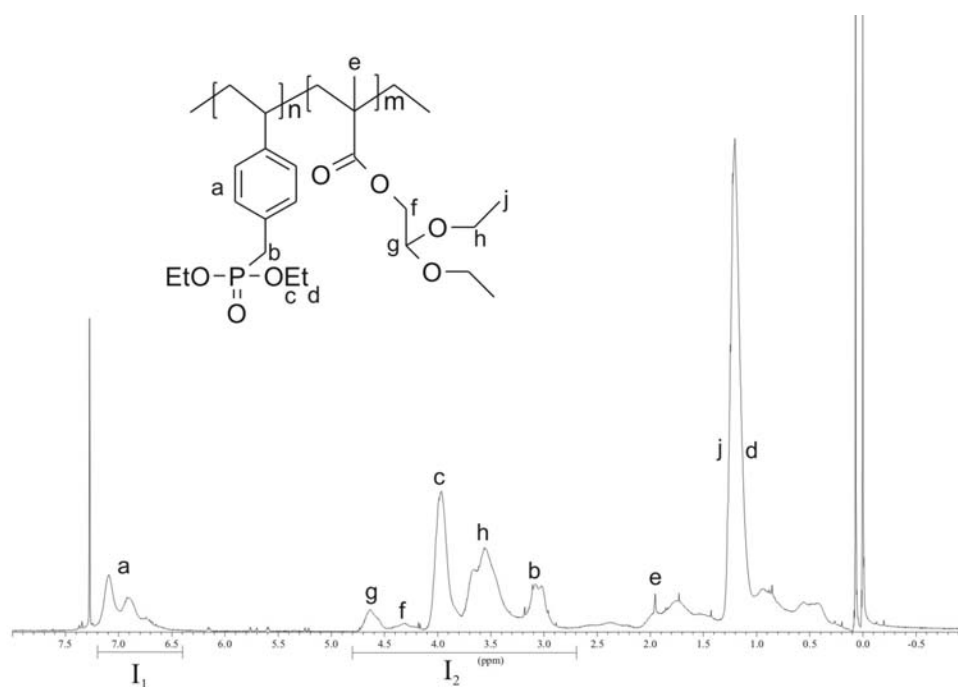


Abbildung 102: ^1H -NMR-Spektrum von Poly-VBP-co-DEEMA mit den Zuordnungen zu den Protonen

Die Anteile der Monomere lassen sich dann mit den folgenden Formeln berechnen:

$$x(VBP) = \frac{7}{I_2 + 1} \quad y(HEMA) = \frac{I_2 - 6}{I_2 + 1}$$

11.2.2 Ellipsometrie

Zur Bestimmung der Schichtdicken wurde ein Multiskop der Firma Optrel verwendet. Bei den Messungen an Luft erfolgte die Auswertung unter Annahme eines Dreischichtsystems mit dem Programm Elli. Dabei wurden die Grenzen der Brechungsindices der Schicht auf 1,4 und 1,6 festgelegt. Die Quellungsmessungen erfolgten mit Hilfe einer Flüssigkeitszelle im Tube-Design von Optrel. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem Programm Elli, die Grenzen der Brechungsindices der Polymerschicht wurden auf 1,3 und 1,6 festgelegt.

11.2.3 Kontaktwinkel

Ein Kontaktwinkelmessgerät der Firma Krüss vom Typ G1 diente zur Durchführung der Kontaktwinkelmessungen. Diese wurden bei einer Neigung von 45° bestimmt, als flüssige Phase wurde dabei Millipore-Wasser eingesetzt.

11.2.4 XPS

Die Untersuchungen mit Hilfe der Photoelektronenspektroskopie wurden von Dr. Wibke Dempwolf am National ESCA and Surface Analysis Center for Biomedical Problems, Departments of Bioengineering and Chemical Engineering, der University of Washington in Seattle und in der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Am National ESCA and Surface Analysis Center for Biomedical Problems wurden die Untersuchungen an einem Kratos AXIS Ultra DLD Instrument unter Verwendung einer monochromatischen Al K α Röntgenstrahlungsquelle durchgeführt. Die Übersichtsspektren wurden mit einer Passenergie von 80 eV aufgenommen. Die Spektren wurden mit einem *take-off*-Winkel von 90° bezogen auf die Probenoberfläche aufgenommen. Im Allgemeinen wurden pro Probe Messungen an drei verschiedenen Punkten durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Vision und CasaXPS.

In der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz wurde die elementare Zusammensetzung mit einem Gerät der Firma Perkin Elmer Physical Electronics, Typ PHI 6500, gemessen. Zur Untersuchung der Probe wurde monochromatische Al K α Strahlung (13 kV) verwendet. Die Spektren wurden typischerweise je 30 Minuten in einem Bereich von

0-1100 eV mit einem *take-off*-Winkel von 45° aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software CASA.

11.2.5 ICP-OES

Die Untersuchungen am ICP-OES wurden von Dipl.-Min. Christiane Schmidt am Institut für Ökologische und Nachhaltige Chemie der TU Braunschweig durchgeführt. Die Elementgehalte wurden mittels eines radialen ICP OES Vista MPX, Fa. Varian, Darmstadt, bestimmt. Die Parameter sind im Analysenbericht wie folgt angegeben: Seaspray-Zerstäuber, Zyklon-Zerstäuberammer, Leistung: 1,20 kW, Plasmagas: 15,0 L Ar / min, Hilfgas: 1,50 L Ar/min, Zerstäuberdruck: 40 PSI, Messzeit: 20 sec, Stabilisierungszeit des Instrumentes: 35 sec, Probenansaugzeit: 35 sec, Pumpgeschwindigkeit: 20 upm, Spülzeit: 10 sec, Wiederholungen der Messungen: 3. Die verwendeten Emissionslinien sind P I 213,618 nm und P I 214,914 nm mit Ar I 470,067 nm als interner Referenzlinie. Die Bestimmung der Elementgehalte erfolgte über externe Kalibrationen.

11.2.6 Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wurde am Institut für Anorganische und Analytische Chemie an einem Vario Micro Prototyp der Firma Elementar Analysensysteme GmbH im CHNS-Modus durchgeführt.

11.2.7 AFM

Die AFM-Messungen wurden von Dr. Wibke Dempwolf am Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Clausthal an einem Multi ModeTM Scanning Probe Microscope Nano Scape III der Firma Digital Instruments durchgeführt. Das Programm NanoScope ® III Version 5.13r9 zur Aufnahme der Daten und zur Auswertung wurde ebenfalls von Digital Instruments bereitgestellt.

11.2.8 REM

Die REM-Aufnahmen der beschichteten Titanplättchen wurden von Anita Scherbarth auf einem selbstklebenden Kohlepad an einem Gerät des Typs JSM-6400 der Firma JEOL am Institut für Technische Chemie gemessen.

11.2.7 Polieren

Die Titanplatten wurden mit einer Poliermaschine der Firma Bühler, Typ Phönix 4000, geschliffen und poliert. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Polierbedingungen

<i>Polierscheibe</i>	<i>Geschwindigkeit [rpm]</i>	<i>Zeit [min]</i>	<i>Zugabe von</i>
P 800	300	3	H ₂ O
P 1200	300	3	H ₂ O
P 2500	150	4-5	H ₂ O/Essigsäure 10%
Polierteller	150	5-6	H ₂ O/Schleifpaste

11.2.8 Spin-coating

Zur Herstellung der spin-coating-Filme wurde ein Spin-Coater der Firma Specialty Coating Systems aus der Serie P6700 sowie der Nano-Mag DA08 verwendet. Bei dem Nano-Mag DA08 handelt es sich um einen Eigenbau von Rolf Harrendorf (Werkstatt des Instituts für Technische Chemie) und Bernd Sladeczek (Elektronikwerkstatt des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie). Der Nano-Mag DA08 wird mit einem ebmpapst DC-Motor BCI5287 betrieben, der eine maximale Geschwindigkeit von 3100 U/min erzeugen kann. Das Vakuum wird mit einer Vakuumpumpe KNF N022 AN 18 generiert und erreicht ein Minimum von 100 mbar. Zur Beschichtung wird das Polymer in einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst und jeweils 50 µL dieser Lösung auf ein Titanplättchen gegeben, welches dann auf dem Spin-Coater etwa 30 Sekunden mit 2000 rpm lang gedreht wird.

11.3 Monomersynthesen

11.3.1 Synthese von Vinylbenzylphosphonat

In einem 250 mL Zweihalskolben mit Tropftrichter werden unter Stickstoff-Atmosphäre bei 0 °C 3,54 g (118 mmol) Natriumhydrid in 65 mL trockenem THF gelöst. Mit Hilfe des Tropftrichters werden 19 mL (147 mmol) Diethylphosphit hinzuge tropft und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. In einem weiteren 500 mL Dreihalskolben werden ebenfalls unter

Stickstoff-Atmosphäre und bei 0 °C 1,762 g (11,7 mmol) Natriumiodid in 65 mL trockenem THF gelöst und 16,7 mL (119 mmol) Vinylbenzylchlorid hinzugefügt. Die zweite Reaktionslösung wird weiterhin gekühlt, während die erste über einen Tropftrichter langsam hinzugetropft wird. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend werden die Salze mit 150 mL Ethylacetat ausgefällt. Der entstehende Feststoff wird abgetrennt und mit wenig Lösungsmittel gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Ethylacetat als Laufmittel. Ausbeute: 18,4 g (72 mmol/61 %)

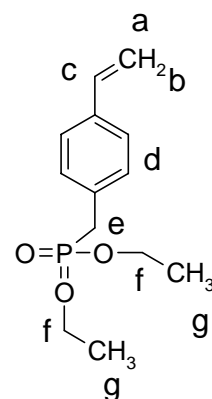
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm):

7,36-7,23 (m, 4 H, H_d), 6,73-6,64 (dd, 1 H, H_c , $J=10,9$, 17,6),

5,76-5,69 (dt, 1 H, H_b , $J=0,9$, 17,6), 5,24-5,20 (dt, 1 H, H_a , $J=0,9$, 10,9),

4,07-3,96 (m, 4 H, H_f), 3,17-3,10 (d, 2 H, H_e , $J=21,8$),

1,27-1,22 (t, 6 H, H_g , $J=7,1$)



$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm):

136,48 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 136,45 ($\text{CCH}=\text{CH}_2$), 130,00 (CCH_2), 129,91

(CCHCHCCH_2), 126,43 (CCHCHCCH_2), 113,72 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 62,23 (CH_2O), 34,50 (CH_2P),

16,38 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$)

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm):

26,77

11.3.2 Synthese von trimethylsilyl-geschütztem Hydroxyethylmethacrylat

In einem 500 mL Dreihalskolben mit Tropftrichter werden unter Stickstoff-Atmosphäre 50 mL (412 mmol) Hydroxyethylmethacrylat und 43,3 g (720 mmol) Harnstoff vorgelegt. Die Reaktionsmischung wird auf 0 °C gekühlt und über den Tropftrichter werden langsam 90,9 mL (716 mmol) Trimethylsilylchlorid hinzugetropft. Zunächst wird das Reaktionsgemisch nun eine Stunde bei 0 °C und anschließend 12 weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufreinigung wird nach Zugabe von etwas Methoxyphenol bei $7,6 \cdot 10^{-2}$ mbar destilliert und anschließend zur Abtrennung des Stabilisators das Monomer

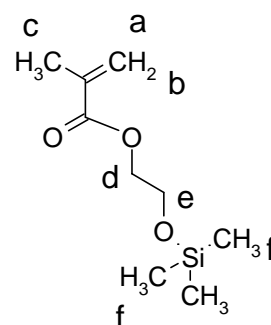
unter denselben Bedingungen abdestilliert. Die Kopf­temperatur beträgt ca. 38 °C. Ausbeute: 46,4 g (230 mmol / 56 %)

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm):

6,00-5,99 (m, 1 H, $H_{a/b}$), 5,45-5,43 (q, 1 H, $H_{a/b}$, $J=1,6$),
4,11-4,07 (t, 2 H, $J=5,0$, $H_{d/e}$), 3,71-3,68 (t, 2 H, $H_{d/e}$, $J=5,0$),
1,82 (dd, 3 H, H_c , $J=1,0$; 1,6), 0,00 (s, 3 H, H_f)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm):

167,39 (C=O), 136,25 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 125,56 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 65,85 (CH_2O),
60,66 (CH_2OSi), 18,30 (CH_3), -0,5 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

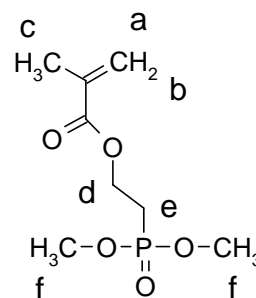


11.3.3 Synthese von Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonat

In einem 500 mL Dreihalskolben mit Tropftrichter werden unter Stickstoff-Atmosphäre 25 mL (202 mmol) Dimethyl-2-hydroxyethylphosphonat, 28,2 mL (202 mmol) Triethylamin und 4 Spatelspitzen 2,6-Di-tertbutylparacresol in 315 mL Dichlormethan (HPLC) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird auf 0 °C gekühlt. Über den Tropftrichter werden 23,5 mL (242 mmol) Methacrylsäurechlorid gelöst in 45 mL Dichlormethan (HPLC) langsam hinzuge­tro­pft. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, werden 40 mL Diethylether hinzugeben um die Ammoniumsalze zu fällen. Diese werden durch Filtration entfernt und der Filterkuchen mit einem Gemisch aus Dichlormethan/Diethylether (ca. 10:3) gewaschen. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer auf die Hälfte eingengt. Durch Zugabe von Diethylether werden erneut die Salze ausgefällt. Dieses Vorgehen wird drei Mal wiederholt. Zur Aufreinigung wird das Rohprodukt bei $8 \cdot 10^{-3}$ mbar destilliert, die Kopf­temperatur des Dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)phosphonats beträgt ca. 100 °C. Ausbeute: 18,3 g (88 mmol / 44 %)

^1H -NMR (MeOH-d_4 , 300 MHz, δ in ppm):

6,13-6,11 (m, 1 H, $H_{a/b}$), 5,65-5,63 (q, 1 H, $H_{a/b}$, $J=1,6$),
4,41-4,31 (dt, 2 H, H_d , $J=7,0$; 16), 3,83-3,80 (d, 2 H, H_e , $J=7,5$),
2,35-2,24 (dt, 6 H, H_f , $J=7,0$; 18,5), 1,94-1,93 (dd, 3 H, H_c , $J=1,0$; 1,6)



^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz, δ in ppm):

166,88 (C=O), 135,85 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}_2$), 125,91 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 58,54 (CH_2O),
52,4 (CH_3), 25,79 (CH_2P), 18,10 (CH_3)

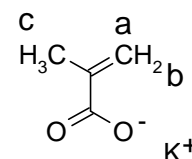
11.3.4 Diethoxyethylmethacrylat

a) Synthese der Vorstufe Kaliummethacrylat

In einem 500 mL Dreihalskolben mit Tropftrichter werden unter Stickstoffatmosphäre 14,963 g (266 mmol) Kaliumhydroxid vorgelegt. Der Tropftrichter wird mit 22 mL (260 mmol) Methacrylsäure gelöst in 80 mL Methanol befüllt und das Gemisch langsam zum Kaliumhydroxid getropft. Dabei ist darauf zu achten, dass keine zu starke Wärmeentwicklung auftritt. Nachdem die Lösung vollständig zugetropft wurde, wird noch weitere 30 Minuten gerührt und anschließend das entstandene Salz in Aceton ausgefällt. Der Feststoff wird über eine Fritte abgesaugt und unter Vakuum getrocknet. Zur Aufreinigung wird der Feststoff aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 34%

^1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz, δ in ppm):

5,62-5,61 (m, 1 H, $\text{H}_{\text{a/b}}$), 5,11-5,09 (dt, 1 H, $\text{H}_{\text{a/b}}$, $J=1,5;4,2$), 1,8 (t, 3 H, H_{c})



^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz, δ in ppm):

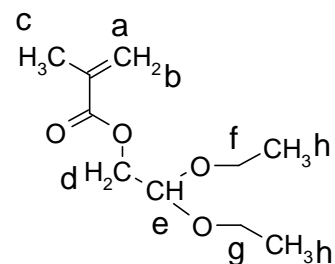
176,95 (C=O), 144,78 (C=CH₂), 119,71 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 20,1 (CH_3)

b) Synthese von Diethoxyethylmethacrylat

In einem 250 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler werden unter Stickstoff-Atmosphäre 11,0 g (87,7 mmol) Kaliummethacrylat und 15 mL (99,7 mmol) 2-Brom-1,1-diethoxyethan in 60 mL DMF gelöst. Anschließend werden 0,08 g (0,4 mmol) Tetramethylammoniumiodid und 0,06 g 4-Methoxyphenol hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird schnell auf 150 °C erhitzt und zwei Stunden gerührt. Nachdem das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird der entstandene Rückstand abfiltriert und der Filterkuchen mit DMF gewaschen, bis das Filtrat farblos ist. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand unter vermindertem Druck bei 17 mbar destilliert. Die Kopftemperatur beträgt 102 °C.

^1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz, δ in ppm):

6,14-6,13 (m, 1 H, $H_{a/b}$), 5,59-5,57 (q, 1 H, $H_{a/b}$, $J=1,6$),
 4,75-4,71 (t, 1 H, H_e , $J=5,5$), 4,17-4,16 (d, 2 H, H_d , $J=5,5$),
 3,78-3,67 (dq, 2 H, $H_{f/g}$, $J=7;10$), 3,63-3,53
 (dq, 2 H, $H_{f/g}$, $J=7;10$), 1,95 (dd, 3 H, H_c , $J=1; 1,5$), 1,24-1,20
 (t, 6 H, H_h , $J=7$)



^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz, δ in ppm):

167,03 ($\text{C}=\text{O}$), 136,00 ($\text{CH}_2=\text{CCH}_3$), 125,90 ($\text{CH}_2=$), 99,60 (CHO), 64,18 (OCH_2), 62,45 (2
 C, OCH_2CH_3), 18,27 ($=\text{CCH}_3$), 15,29 (2 C, CH_2CH_3)

11.4 Copolymerisationen

11.4.1 Synthese von Poly-VBP-co-GMA

Zunächst werden 1 molare Lösungen der Monomere sowie eine 0,1 molare Lösung von AIBN in trockenem THF hergestellt. Die Monomer-Lösungen werden in verschiedenen Verhältnissen mit einem Gesamtvolumen von 4 mL in Schraubreagenzgläsern gemischt und 0,4 mL der AIBN-Lösung hinzugegeben. Die Reaktionslösungen werden ca. 30 Sekunden mit Stickstoff gespült und anschließend 4 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Abbruch der Reaktion in Eis werden die Polymere in kaltem Petrolether ausgefällt. Die Aufreinigung erfolgt durch erneutes Ausfällen in kaltem Petrolether aus einer Lösung in THF. Die Ausbeuten liegen zwischen 10 und 35 %.

11.4.2 Synthese von Poly-VBP-co-HEMA-TMS und Entfernen der Schutzgruppe

1 molare Lösungen der Monomere in THF werden in verschiedenen Verhältnissen zu einem Gesamtvolumen von 4 mL in Schraubreagenzgläsern gemischt und mit Hilfe einer 0,1 molaren Lösung in THF 1 mol% AIBN hinzugefügt. Die Reaktionslösungen werden ca. 30 Sekunden mit Stickstoff gespült und anschließend 7 bzw. 16 Stunden bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Kühlung mit Eis abgebrochen und die Polymere in kaltem Petrolether ausgefällt. Die getrockneten Polymere werden in wenig THF gelöst und zur Entfernung der Schutzgruppe je nach Menge mit 0,7-1,5 mL einer 3 molaren Lösung von HCl in Methanol versetzt. Nachdem die Reaktionslösungen ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurden, werden die Polymere in kaltem Diethylether ausgefällt. Die Ausbeuten liegen zwischen 20 und 50%.

11.4.3 Synthese von Poly-DMMEP-co-HEMA-TMS und Entfernen der Schutzgruppe

Die Monomere werden mit einer Konzentration von 1 mol/L in trockenem THF gelöst und in verschiedenen Verhältnissen in Schraubreagenzgläsern zu einem Gesamtvolumen von 4 mL gemischt. Anschließend werden 0,4 mL einer 0,1 molaren Lösung von AIBN in THF hinzugefügt und die Reaktionslösungen ca. 30 Sekunden mit Stickstoff gespült. Die Reaktionsgemische werden 5 Stunden bei 60 °C gerührt und durch Eintauchen in ein Eisbad abgebrochen. Die Polymere werden in kaltem Petrolether ausgefällt. Zur Entfernung der Schutzgruppe werden die Polymere in wenig Methanol gelöst und je nach Menge mit 0,7-1 mL einer 3 molaren Lösung von HCl in Methanol versetzt. Nachdem die Lösungen ca. 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurden, werden die Polymere in kaltem Diethylether ausgefällt.

11.4.4 Synthese von Poly-VBP-co-DEEMA

Aus den Monomeren werden 1 molare Lösungen in THF hergestellt und in Schraubreagenzgläsern in verschiedenen Verhältnissen zu einem Gesamtvolumen von 4 mL gemischt. Mit Hilfe einer 0,1 molaren Lösung von AIBN in THF wird 1 mol% des Initiators hinzugegeben. Die Reaktionslösungen werden ca. 30 Sekunden mit Stickstoff gespült und anschließend 16 Stunden bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Eintauchen in ein Eisbad abgebrochen und die Polymere in Petrolether ausgefällt, wobei der Petrolether mit Hilfe eines Ethanol/Stickstoffbades gekühlt wird. Zur Aufreinigung werden die Polymere in wenig THF gelöst und erneut in sehr kaltem Petrolether ausgefällt. Die Ausbeuten betragen zwischen 25 und 50 %.

11.5 Aufbringen der Polymere auf die Oberfläche

Nachdem Schleifen und Polieren werden die Titanplättchen zunächst mit verschiedenen Lösungsmitteln gereinigt. Dazu werden sie mit destillierten Lösungsmitteln im Ultraschallbad gewaschen (4 x 10 Minuten mit Dichlormethan, je 2 mal 10 Minuten mit Aceton, Methanol und Millipor-Wasser). Nach den Hintergrundmessungen für die Ellipsometrie werden die Plättchen erneut jeweils 2 mal 10 Minuten mit den oben genannten Lösungsmitteln gewaschen, dieses Mal werden aber solche in HPLC-Qualität verwendet.

Zum Aufbringen der Polymere auf die Titanplättchen wurden je nach Polymer verschiedene Verfahren angewendet. Poly-VBP-co-GMA und Poly-VBP-co-DEEMA werden mittels spin-

coating aufgebracht. Dazu wird das Polymer mit einer Konzentration von 10 mg/mL in trockenem THF ca. 30 Minuten unter Schütteln gelöst. Mit Hilfe des Spin-Coaters werden die Plättchen jeweils mit 50 μ L dieser Lösung beschichtet. Anschließend werden die Plättchen ca. 17 Stunden bei 120 °C getempert und 6 mal 10 Minuten mit THF im Ultraschallbad gewaschen.

Poly-VBP-co-HEMA und Poly-DMMEP-co-HEMA werden sowohl mittels spin-coating als auch über ein Tauch-Verfahren auf die Plättchen aufgebracht. Für letzteres werden die Polymere mit verschiedenen Konzentrationen in Methanol gelöst und die Plättchen in 1 mL dieser Lösung ca. 16 Stunden mit Hilfe eines Laborschüttlers (IKA KS 260 basic) bewegt. Anschließend werden die Plättchen vorsichtig aus der Lösung entnommen und daran anhaftende Lösungsrückstände verdunsten gelassen, bevor sie ebenfalls bei 120 °C ca. 16 Stunden getempert werden. Danach werden die Plättchen 6 mal 10 Min. mit Methanol im Ultraschallbad gewaschen.

11.6 Reaktionen auf der Oberfläche

11.6.1 Umsetzung mit Ethylendiamin

Bei der Umsetzung der Filme aus Poly-VBP-co-GMA mit Ethylendiamin wurde zunächst eine Lösung 1:10 von Ethylendiamin in Millipore-Wasser hergestellt und die Plättchen mit jeweils 1 mL davon bedeckt. Auf dem Laborschüttler wurden die Plättchen dann über Nacht in der Lösung geschüttelt, wobei das Experiment entweder im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. 10 °C, bei Raumtemperatur oder im Kleinbrutschrank (Typ B15 von Thermo Scientific) bei 37 °C durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Plättchen 5 Mal für jeweils 5 Minuten mit 0,125 M Natriumtetraborat-Puffer (pH = 10,0) mit 0,066 % (w/v) Natriumdodecylsulfat und 2 Mal 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet.

11.6.2 Umsetzung mit CDI zur Aktivierung

Zur Aktivierung der Hydroxygruppen des Poly-VBP-co-HEMAs und Poly-DMMEP-co-HEMAs werden die beschichteten Titanplatten mit 1 mL einer 0,3 molaren Lösung von Carbonyldiimidazol (CDI) in Dioxan bedeckt und 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden die Plättchen zwei Mal 10 Minuten mit Dioxan im Ultraschallbad gewaschen, um überschüssiges CDI zu entfernen.

11.6.3 Entfernen der Schutzgruppe an Poly-VBP-co-DEEMA

Um die Schutzgruppe zu entfernen, werden die beschichteten Plättchen mit jeweils 1 mL 1 molarer HCl oder Phosphorsäure bedeckt und 15, 60 oder 120 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Plättchen aus der Säure herausgenommen, mit Millipore-Wasser abgespült und zwei Mal 10 Minuten im Ultraschallbad mit Millipore-Wasser gewaschen.

11.7 *In-vitro*-Untersuchungen

11.7.1 Immobilisierung von BMP2

Prof. Dr. Andrea Hoffmann oder Dr. Virginia Seiffart vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung führten die Immobilisierung von BMP2 durch. Dazu werden die beschichteten Titanplättchen in 24-Well-Platten gelegt und mit einer Lösung aus 250 µg/mL BMP2 in 50×10^{-3} M MES-Puffer mit pH 5,0 oder zur Negativ-Kontrolle nur mit MES-Puffer bedeckt und bei 4 °C über Nacht leicht geschüttelt. Zur Entfernung des nicht gebundenen Proteins werden die Plättchen anschließend 8 mal 5 Minuten mit 0,125 M Natriumtetraborat-Puffer (pH = 10,0) mit 0,066 % (w/v) Natriumdodecylsulfat gewaschen und zuletzt 5 Minuten mit PBS gespült.

11.7.2 ELISA

Der ELISA-Test wurde von Prof. Dr. Andrea Hoffmann oder Dr. Virginia Seiffart am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Zunächst werden die unspezifischen Protein-Bindungsstellen mit 10 % FCS in PBS über Nacht geblockt. Anschließend werden die Plättchen mit 0,1 % (w/v) Tween-20 in Tris-buffered saline (TTBS) gewaschen. Monoklonale Maus-Anti-BMP2 Antikörper (R&D) werden 1:200 in 10 % FCS verdünnt und auf den Plättchen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit TTBS wird das Peroxidase-Konjugat eines Ziege-Anti-Maus-Antikörpers (Dianova) (1:10000 in 10 % FCS verdünnt) hinzugegeben und erneut eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Bestimmung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung (KemEnTec), die mit Schwefelsäure gestoppt wurde, ausgeführt. Die Absorbanz wurde als Differenz zwischen 450 und 620 nm gemessen.

11.7.3 BREluc

Prof. Dr. Andrea Hoffmann oder Dr. Virginia Seiffart führten den BREluc-Test am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung durch. Murine C2C12-Vorläufer-Zellen (erhalten von ATCC via LGC Promochem) wurden in hoch-glukosem DMEM, welches 10 % FCS, Penicillin/Streptomycin and 4×10^{-3} M Glutamin enthält, kultiviert. Zur Erzeugung der C2C12/BREluc-Zellen werden die Zellen einen Tag bevor der Transfektion mit einer Dichte von 20 000 Zellen pro Well auf einer 12-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit dem BREluc Expressionsplasmid, das auf BMP ansprechende Elemente kodiert, und dem Auswahlplasmid pAG60, das Resistenz gegenüber G418 verleiht, mit Hilfe von DOSPERTM (Roche) dauerhaft transfiziert.

11.7.4 Kompatibilitätstest

Der Kompatibilitätstest wurde von Prof. Dr. Andrea Hoffmann am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Zur Überprüfung der Biokompatibilität der Polymerbeschichtungen wird das Wachstum von mesenchymalen Vorläuferzellen (C3H10T $\frac{1}{2}$), die rekombinant BMP2 exprimieren, untersucht. Die Zellen werden in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit 10 % FCS/ 2×10^{-3} M Glutamin plus Penicillin/Streptomycin mit einem Zusatz von 5 µg/mL Puromycin aufgezogen. Die polymerbeschichteten Glassubstrate (2,5 x 2,5 cm²) werden in Petrischalen (19 cm², TCPS) gelegt und die Zellen mit einer Dichte von 7500 Zellen/cm² darauf ausgesät. Am nächsten Tag werden die Substrate in eine neue Petrischale transferiert. Beim Erreichen der Konfluenz werden 50 µg/mL Ascorbinsäure und 0,01 M β -Glycerophosphat zum Medium hinzu gegeben um ein sogenanntes Mineralisationsmedium zu erhalten, welches die Entstehung von Osteoblasten fördert. Das Medium wurde jeden 2 oder 3 Tag ausgetauscht. Das Zellwachstum wurde mikroskopisch verfolgt und fotografisch dokumentiert. Als die Zellen in den TCPS-Petrischalen am 5. Tag Konfluenz zeigten, wurde das Zellwachstum auf den Substraten bestimmt. Ein Fibroblastartiges oder sternförmiges Aussehen der Zellen wurde als Zeichen für die Vitalität der Zellen definiert, runde oder abgelöste Zellen deuten auf ungesunde Zellen und bei hoher Anzahl auf Zytotoxizität der Beschichtung hin.

Der LDH-Test wurde in der Medizinischen Hochschule Hannover von Dr. Andreas Winkel durchgeführt. Dazu wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche sowie humane Gingiva-Fibroblasten verwendet und nach 24 und 72 Stunden REM-Aufnahmen von den Zellen auf der Oberfläche gemacht.

11.8 *In-vivo*-Untersuchungen

Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten *in-vivo*-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andrea Hoffmann vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung und Priv.-Doz. Dr. med. Fritz Thorey von der Orthopädischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover realisiert. Eine ausführliche Beschreibung der Versuche findet sich in der Veröffentlichung von THOREY et al.^[255]

12 Literatur

- [1] *Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik). Diagnosen, Prozeduren und Fallpauschalen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. 2008*, Statistisches Bundesamt, **2009**.
- [2] H. Merx, K. Dreinhöfer, P. Schröder, T. Stürmer, W. Puhl, K.-P. Günther, H. Brenner, *Ann. Rheum. Dis.* **2003**, 62, 222–226.
- [3] P.-I. Brånemark, U. Breine, R. Adell, B. Hansson, J. Lindstrom, Å. Ohlsson, *Scand. J. Reconstr. Surg.* **1969**, 3, 81.
- [4] D. F. Williams, *J. Med. Eng. Technol.* **1977**, 1, 195.
- [5] D. F. Williams, *J. Med. Eng. Technol.* **1977**, 1, 266.
- [6] D. M. Brunette, P. Tengval, M. Textor, *Titanium in Medicine*, Springer, Berlin, **2001**.
- [7] S. J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer, H. Sigrist, *Langmuir* **1998**, 14, 5507.
- [8] J. Gallo, P. Kamínek, V. Tichá, P. Řiháková, R. Ditmar, *Biomed. Papers* **2002**, 146, 21–28.
- [9] M. Skutek, R. B. Bourne, S. J. MacDonald, *Current Orthopaedics* **2006**, 20, 157–161.
- [10] M. Otto, J. Kriegsmann, T. Gehrke, S. Bertz, *Pathologe* **2006**, 27, 447–460.
- [11] S. P. Zysk, H. H. Gebhard, C. Pellengahr, H. J. Refior, W. Plitz, K. Meßmer, A. Veihelmann, *Orthopäde* **2003**, 32, 305–311.
- [12] P. Drees, A. Eckardt, R. E. Gay, S. Gay, L. C. Huber, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2007**, 3, 165.
- [13] R. Bitton, *Am. J. Manag. Care* **2009**, 15, 230.
- [14] C. R. Bragdon, A. M. Doherty, H. E. Rubash, M. Jasty, X. J. Li, H. Seeherman, W. H. Harris, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2003**, 417, 50.
- [15] M. Dettin, T. Herath, R. Gambaretto, G. Iucci, C. Battocchio, A. Bagno, F. Ghezzi, C. Di Bello, G. Polzonetti, L. Di Silvio, *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**, 91A, 463.
- [16] C. Viorner, H. L. Guenther, B.-O. Aronsson, P. Péchy, P. Descouts, M. Grätzel, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 62, 149–155.
- [17] M. M. Shalabi, A. Gortemaker, M. A. V. t. Hof, J. A. Jansen, N. H. J. Creugers, *J. Dent. Res.* **2006**, 85, 496.
- [18] I. d. M. O. Bernal, I. Risa, K. Hiroki, T. Ken-Ichiro, Y. Naoko, T. Toshi-Ichiro, N. Kunitaru, M. Masahiko, *J. Gifu. Dent. Soc.* **2009**, 35, 89.
- [19] J. H. M. Goosen, A. J. Kums, B. J. Kollen, C. C. P. M. Verheyen, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2009**, 129, 1165–1169.

-
- [20] S. S. Rajaratnam, C. Jack, A. Tavakkolizadeh, M. D. George, R. J. Fletcher, M. Hankins, J. A. N. Shepperd, *J. Bone Joint Surg. [Br]* **2008**, *90*, 27.
 - [21] S. L. Bellis, *Biomaterials* **2011**, *32*, 4205.
 - [22] P.-H. Chua, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, W. Wang, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1412.
 - [23] E. S. Gawalt, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, K. S. Midwood, J. E. Schwarzbauer, J. Schwartz, *Langmuir* **2003**, *19*, 200.
 - [24] B. Elmengaard, J. E. Bechtold, K. Søballe, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3521–3526.
 - [25] H. Schliephake, D. Scharnweber, M. Dard, S. Rößler, A. Sewing, J. Meyer, D. Hoogestraat, *Clin. Oral Impl. Res.* **2002**, *13*, 312–319.
 - [26] E. Solheim, *International Orthopaedics* **1998**, *22*, 410–416.
 - [27] U. Fischer, U. Hempel, D. Becker, S. Bierbaum, D. Schwarnweber, H. Worch, K.-W. Wenzel, *Biomaterials* **2003**, *24*, 2631.
 - [28] D. Nikolidakis, G. J. Meijer, D. A. W. Oortgiesen, X. F. Walboomers, J. A. Jansen, *Biomaterials* **2009**, *30*, 94–99.
 - [29] D. R. Sumner, T. M. Turner, A. F. Purchio, W. R. Gombotz, R. M. Urban, J. O. Galante, *J. Bone Joint Surg. [Am]* **1995**, *77*, 1135.
 - [30] D. H. R. Kempen, L. Lu, A. Heijink, T. E. Hefferan, L. B. Creemers, A. Maran, M. J. Yaszemski, W. J. A. Dhert, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2816.
 - [31] C. K. Poh, Z. Shi, T. Y. Lim, K. G. Neoh, W. Wang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1578.
 - [32] J. M. Wozney, V. Rosen, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1998**, *346*, 26.
 - [33] E. A. Wang, W. Rosen, J. S. D'Alessandro, M. Bauduy, P. Cordes, T. Harada, D. I. Israel, R. M. Hewick, K. M. Kerns, P. LaPan, D. P. Luxenberg, D. McQuaid, I. K. Moutsatsos, J. Nove, J. M. Wozney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 2220.
 - [34] J. Hall, R. G. Sorensen, J. M. Wozney, U. M. E. Wikesjö, *J. Clin. Periodontol.* **2007**, *34*, 444–451.
 - [35] Y. Liu, K. d. Groota, E. B. Hunziker, *Bone* **2005**, *36*, 745–757.
 - [36] E. E. Johnson, M. R. Urist, G. A. M. Finerman, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1988**, *230*, 257.
 - [37] E. E. Johnson, M. R. Urist, G. A. M. Finerman, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1988**, *236*, 249.
 - [38] E. E. Johnson, M. R. Urist, G. A. M. Finerman, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1992**, *277*, 229.
 - [39] H. Seeherman, J. M. Wozney, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, *16*, 329.
 - [40] M. Yamamoto, Y. Takahashi, Y. Tabata, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1305.

-
- [41] M. F. Sciadini, K. D. Johnson, *J. Orthop. Res.* **2000**, *18*, 289.
- [42] S.-J. Hong, C.-S. Kim, D.-K. Han, I.-H. Cho, U.-W. Jung, S.-H. Choi, C.-K. Kim, K.-S. Cho, *Biomaterials* **2006**, *27*, 3810–3816.
- [43] M. Morra, *Eur. Cells Mater.* **2007**, *12*, 1.
- [44] Y. Liu, L. Enggist, A. F. Kuffer, D. Buser, E. B. Hunziker, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2677.
- [45] N. Sykaras, R. G. Triplett, M. E. Nunn, A. M. Iacopino, L. A. Opperman, *Clin. Oral Impl. Res.* **2001**, *12*, 339–349.
- [46] J. Mollenhauer, A. Sachse, A. Wagner, M. Keller, O. Wagner, W.-D. Wetzel, F. Layher, R.-A. Venbrocks, P. Hortschansky, M. Pietraszczyk, B. Wiederanders, H. J. Hempel, J. Bossert, J. Horn, K. Schmuck, *Bone* **2005**, *37*, 699.
- [47] M. Hoshino, T. Namikawa, M. Kato, H. Terai, S. Taguchi, K. Takaoka, *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 1042–1051.
- [48] A. Hoffmann, H. A. Weich, G. Gross, G. Hillmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 294.
- [49] V. Karageorgiou, L. Meinel, S. Hofmann, A. Malhotra, V. Volloch, D. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *71A*, 528.
- [50] J. Becker, A. Kirsch, F. Schwarz, M. Chatzinikolaidou, D. Rothamel, V. Lekovic, H. P. Jennissen, *Clin. Oral Invest.* **2006**, *10*, 217.
- [51] G. Voggenreiter, K. Hartl, S. Assenmacher, M. Chatzinikolaidou, H. M. Rumpf, H. P. Jennissen, *Materialwiss. Werkstofftech.* **2001**, *39*, 942.
- [52] X. Liu, P. K. Chu, C. Ding, *Mater. Sci. Eng.* **2004**, *R47*, 49–121.
- [53] D. L. Elbert, J. A. Hubbell, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1996**, *26*, 365.
- [54] P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 270.
- [55] H. F. Hildebrand, N. Blanchemain, G. Mayer, F. Chai, M. Lefebvre, F. Boschini, *Surf. Coat. Technol.* **2006**, *200*, 6318–6324.
- [56] J. Rühe, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1994**, *42*, 1237.
- [57] C. S. S. R. Kumar, *Nanostructured Thin Films and Surfaces, Vol. 5*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2010**.
- [58] J. E. Raynor, T. A. Petrie, A. J. Garcia, D. M. Collard, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 1724.
- [59] G. J. Fleer, M. A. C. Stuart, J. M. H. M. Scheutjens, T. Cosgrove, B. Vincent, *Polymers at Interfaces*, Chapman & Hall, London, **1993**.

-
- [60] S. Minko, in *Polymer Surfaces and Interfaces* (Ed.: M. Stamm), Springer-Verlag, Berlin u.a., **2008**.
- [61] O. Prucker, C. A. Naumann, J. R  he, W. Knoll, C. W. Frank, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8766.
- [62] J. P. Cotton, D. Decker, H. Benoit, B. Farnoux, J. Higgins, G. Jannink, R. Ober, C. Picot, J. d. Cloizeaux, *Macromolecules* **1974**, *7*, 863.
- [63] W. J. v. Ooij, D. Zhu, M. Stacy, A. Seth, T. Mugada, J. Gandhi, P. Puomi, *Tsinghua Sci. Technol.* **2005**, *10*, 639.
- [64] S. Sterman, J. G. Marsden, *Ind. Eng. Chem.* **1966**, *58*, 33.
- [65] M. Chatzinikolaidou, M. Laub, H. M. Rumpf, H. P. Jennissen, *Materialwiss. Werkstofftech.* **2002**, *33*, 720.
- [66] R. M  ller, J. Abke, E. Schnell, F. Macionczyk, U. Gbureck, R. Mehrl, Z. Ruszczak, R. Kujat, C. Englert, M. Nerlich, P. Angele, *Biomaterials* **2005**, *26*, 6962–6972.
- [67] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly*, Academic Press, Boston et al., **1991**.
- [68] R. R. Rye, G. C. Nelson, M. T. Dugger, *Langmuir* **1997**, *13*, 2965.
- [69] P. Silberzan, L. L  ger, D. Ausserr  , J. J. Benattar, *Langmuir* **1991**, *7*, 1647.
- [70] P. Jussila, H. Ali-L  ytty, K. Lahtonen, M. Hirsim  ki, M. Valden, *Surf. Interface Anal.* **2010**, *42*, 157–164.
- [71] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Amer. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481.
- [72] A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533.
- [73] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Science* **1988**, *240*, 62.
- [74] A. Olivier, J.-M. Raquez, P. Dubois, P. Damman, *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 31–39.
- [75] K. W. Kittredge, M. A. Minton, M. A. Fox, J. K. Whitesell, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 788.
- [76] J. M. Stouffer, T. J. McCarthy, *Macromolecules* **1988**, *21*, 1204.
- [77] Y. Nakayama, K. Nakamata, Y. Hirano, K. Goto, T. Matsuda, *Langmuir* **1998**, *14*, 3909.
- [78] J. H. Waite, M. L. Tanzer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 1554.
- [79] H. Lee, N. F. Scherer, P. B. Messersmith, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 12999–13003.
- [80] X. Fan, L. Lin, J. L. Dalsin, P. B. Messersmith, *J. Amer. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15843.

-
- [81] B. P. Lee, C.-Y. Chao, F. N. Nunalee, E. Motan, K. R. Shull, P. B. Messersmith, *Macromolecules* **2006**, *39*, 1740.
- [82] Z. Shi, K. G. Neoh, E. T. Kang, C. K. Poh, W. Wang, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1603–1611.
- [83] H. Lee, J. Rho, P. B. Messersmith, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 431–434.
- [84] M. Guvendiren, P. B. Messersmith, K. R. Shull, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 122–128.
- [85] R. Maoz, J. Sagiv, *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, *100*, 465.
- [86] C. Viorner, Y. Chevolot, D. Léonard, B.-O. Aronsson, P. Péchy, H. J. Mathieu, P. Descouts, M. Grätzel, *Langmuir* **2002**, *18*, 2582.
- [87] E. S. Gawalt, M. J. Avaltroni, N. Koch, J. Schwartz, *Langmuir* **2001**, *17*, 5736.
- [88] R. Quiñones, E. S. Gawalt, *Langmuir* **2007**, *23*, 10123.
- [89] R. Quiñones, A. Raman, E. S. Gawalt, *Surf. Interface Anal.* **2007**, *39*, 593.
- [90] J. G. van Alsten, *Langmuir* **1999**, *15*, 7605.
- [91] A. Raman, M. Dubey, I. Gouzman, E. S. Gawalt, *Langmuir* **2006**, *22*, 6469.
- [92] R. Luschtinetz, A. F. Oliveira, J. Frenzel, J.-O. Joswig, G. Seifert, H. A. Duarte, *Surf. Sci.* **2008**, *602*, 1347–1359.
- [93] W. Guo, S. Chen, H. Ma, *J. Serb. Chem. Soc.* **2006**, *71*, 167–175.
- [94] J. T. Woodward, A. Ulman, D. K. Schwartz, *Langmuir* **1996**, *12*, 3626.
- [95] G. Guerrero, P. H. Mutin, A. Vioux, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4367.
- [96] N. Adden, L. J. Gamble, D. G. Castner, A. Hoffmann, G. Gross, H. Menzel, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2552.
- [97] R. Hofer, M. Textor, N. D. Spencer, *Langmuir* **2001**, *17*, 4014.
- [98] I. Gouzman, M. Dubey, M. D. Carolus, J. Schwartz, S. L. Bernasek, *Surf. Sci.* **2006**, *600*, 773–781.
- [99] R. Adadi, G. Zorn, R. Brener, I. Gotman, E. Y. Gutmanas, C. N. Sukenik, *Thin Solid Films* **2010**, *518*, 1966.
- [100] P. H. Mutin, V. Lafond, A. F. Popa, M. Granier, L. Markey, A. Dereux, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 5670.
- [101] S. Pawsey, M. McCormick, S. D. Paul, R. Graf, Y. S. Lee, L. Reven, H. W. Spiess, *J. Amer. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4174.
- [102] V. Lafond, C. Gervais, J. Maquet, D. Prochnow, F. Babonneau, P. H. Mutin, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4098.

-
- [103] G. Mani, D. M. Johnson, D. Marton, V. L. Dougherty, M. D. Feldman, D. Patel, A. A. Ayon, C. M. Agrawal, *Langmuir* **2008**, *24*, 6774.
- [104] J. Schwartz, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, J. E. Schwarzbauer, K. S. Midwood, E. S. Gawalt, *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, *23*, 395.
- [105] N. Adden, L. J. Gamble, D. G. Castner, A. Hoffmann, G. Gross, H. Menzel, *Langmuir* **2005**, *22*, 8197.
- [106] A. Zeller, A. Musyanovych, M. Kappl, A. Ethirajan, M. Dass, D. Markova, M. Klapper, K. Landfester, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 2421–2428.
- [107] R. Barbucci, E. Arturoni, G. Panariello, C. Di Canio, *J. Biomed. Mater. Res.* **2010**, *95A*, 58.
- [108] R. E. Taylor, in *Protein Immobilization Fundamentals and Applications* (Eds.: R. F. Taylor, M. Dekker), New York, **1991**.
- [109] N. A. N. Ugarova, O. V. Lebedeva, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *15*, 35.
- [110] M. Nasri, D. Thomas, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *15*, 119.
- [111] P. M. Saladin, B. D. Zhang, J. M. Reichert, *IDrugs* **2009**, *12*, 779.
- [112] D. S. Pisal, M. P. Kosloski, S. V. Balu-Iyer, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 2557.
- [113] A. K. Nayak, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2010**, *2*, 1.
- [114] M. R. Urist, *Science* **1965**, *150*, 893.
- [115] C. A. Kirker-Head, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000**, *43*, 65.
- [116] X. Jiao, P. C. Billings, M. P. O’Connell, F. S. Kaplan, E. M. Shore, D. L. Glaser, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1080–1086.
- [117] E. H. J. Groeneveld, E. H. Burger, *Eur. J. Endocrinol.* **2000**, *142*, 9.
- [118] W. Balemans, W. V. Hul, *Dev. Biol.* **2002**, *250*, 231–250.
- [119] A. v. Bubnoff, K. W. Y. Cho, *Dev. Biol.* **2001**, *239*, 1–14.
- [120] J. R. Lieberman, A. Daluiski, T. A. Einhorn, *J. Bone Jt. Surg.* **2002**, *84*, 1032.
- [121] P. Ten Dijke, J. Fu, P. Schaap, B. A. J. Roelen, *J. Bone Jt. Surg.* **2003**, *85A*, 34.
- [122] E. Canalis, A. N. Economides, E. Gaggero, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 218–235.
- [123] T. A. Einhorn, R. M. Majeska, A. Mohaideen, E. M. Kagel, M. L. Bouxsein, T. T. Turek, J. M. Wozney, *J. Bone Jt. Surg.* **2003**, *85A*, 1425.
- [124] T. J. Blokhuis, F. C. d. Boer, J. A. M. Bramer, J. M. G. T. Jenner, F. C. Bakker, P. Patka, H. J. T. M. Haarman, *Biomaterials* **2001**, *22*, 725.
- [125] V. Luginbuehl, L. Meinel, H. P. Merkle, B. Gander, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 197.
- [126] Z. S. Haidar, R. C. Hamdy, M. Tabrizian, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1817.

-
- [127] O. P. Gautschi, S. P. Frey, R. Zellweger, *ANZ J. Surg.* **2007**, *77*, 626.
- [128] D. R. Sumner, T. M. Turner, R. M. Urban, T. Turek, H. Seeherman, J. M. Wozney, *J. Orthop. Res.* **2004**, *22*, 58.
- [129] U. M. E. Wikesjö, P. Guglielmoni, A. Promsudthi, K.-S. Ch, L. Trombelli, K. A. Selvig, L. Jin, J. M. Wozney, *J. Clin. Periodontol.* **1999**, *26*, 392–400.
- [130] *Am. J. Sports Med.* **1999**, *27*, 476.
- [131] M. Kanatani, I. Sugimoto, H. Kaji, T. Kobayashi, K. Nishiyama, M. Fukase, M. Kumegawa, K. Chihara, *J. Bone Miner. Res.* **1995**, *10*, 1681.
- [132] G. Schmidmaier, P. Schwabe, C. Strobel, B. Wildemann, *Injury* **2008**, *39S2*, S37–S43.
- [133] T. Albrektsson, C. Johansson, *Eur. Spine J.* **2001**, *10*, S96.
- [134] Z. S. Haidar, R. C. Hamdy, M. Tabrizian, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1825.
- [135] J. P. M. Issa, C. d. Nascimento, M. V. L. B. Bentley, E. A. D. Bel, M. M. Iyomasa, W. Sebal, R. F. d. A. Jr., *Micron* **2008**, *39*, 373–379.
- [136] J. P. M. Issa, A. C. C. Spadaro, M. V. L. B. Bentley, M. M. Iyomasa, S. Siéssere, S. C. H. Regalo, H. L. A. Defino, *Micron* **2008**, *39*, 952–959.
- [137] H. D. Kim, R. F. Valentini, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59*, 573–584.
- [138] B. Barnes, S. D. Boden, J. Louis-Ugbo, P. R. Tomak, J.-S. Park, M.-S. Park, A. Minamide, *Spine* **2005**, *30*, 1127.
- [139] A. J. Haddad, S. A. F. Peel, C. M. L. Clokie, G. K. B. Sándor, *J. Craniofac. Surg.* **2006**, *17*, 926.
- [140] B. H. Woo, G. Jiang, Y. W. Jo, P. P. DeLuca, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1600.
- [141] N. Saito, Takaoka, *Biomaterials* **2003**, *24*, 2287.
- [142] N. Saito, N. Murakami, J. Takahashi, H. Horiuchi, H. Ota, H. Kato, T. Okada, K. Nozaki, K. Takaoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 1037–1048.
- [143] R. Kenley, L. Marden, T. Turek, L. Jin, E. Ron, J. O. Hollinger, *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, *28*, 1139.
- [144] G. Wei, Q. Jin, W. V. Giannobile, P. X. Ma, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2087–2096.
- [145] Z. S. Haidar, R. C. Hamdy, M. Tabrizian, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1207e1215.
- [146] M. Geiger, R. H. Li, W. Friess, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 1613–1629.
- [147] P. C. Bessa, M. Casal, R. L. Reis, *J. Tissue Eng. Regener. Med.* **2008**, *2*, 81–96.
- [148] Y. Liu, E. B. Hunziker, C. V. d. Vaal, K. d. Groot, *Key Eng. Mater.* **2004**, *254-256*, 619.
- [149] M. Sokolsky-Papkova, K. Agashib, A. Olayeb, K. Shakesheff, A. J. Domba, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 187–206.

-
- [150] H. Schliephake, A. Aref, D. Scharnweber, S. Bierbaum, S. Roessler, A. Sewing, *Clin. Oral Impl. Res.* **2005**, *16*, 563–569.
 - [151] K. Bessho, D. L. Carnes, R. Cavin, H.-Y. Chen, J. L. Ong, *Clin. Oral Impl. Res.* **1999**, *10*, 212.
 - [152] M. Chatzinikolaidou, T. K. Lichtinger, R. T. Müller, H. P. Jennissen, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4405.
 - [153] K. Kashiwagi, T. Tsuji, K. Shiba, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1166.
 - [154] H. P. Jennissen, T. Zumbrink, M. Chatzinikolaidou, J. Steppuhn, *Materialwiss. Werkstofftech.* **1999**, *30*, 838.
 - [155] D. A. Puleo, L. J. Mikulec, *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *32*, 203.
 - [156] T. Crouzier, K. Ren, C. Nicolas, C. Roy, C. Picart, *Small* **2009**, *5*, 598.
 - [157] C. Brunot, B. Grosgeat, C. Picart, C. Lagneau, N. Jaffrezic-Renault, L. Ponsonnet, *Dent. Mater.* **2008**, *24*, 1025.
 - [158] L. G. Bachas, S. V. Rao, K. W. Anderson, *Mikrochim. Acta* **1998**, *128*, 127.
 - [159] F. Hillger, *Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2, BMP-2 und dem BMP-2-Propeptid*, Dissertation, Martin-Luther-Universität, **2005**.
 - [160] J. M. S. Cabral, J. F. Kennedy, in *Protein Immobilization Fundamentals and Applications* (Eds.: R. F. Taylor, M. Dekker), New York, **1991**.
 - [161] V. V. Mozhaev, N. S. Melik-Nubarov, M. V. Sergeeva, V. Šikšnis, K. Martinek, *Biocatalysis* **1990**, *3*, 179.
 - [162] C. Mateo, V. Grazú, B. C. C. Pessela, T. Montes, J. M. Palomo, R. Torres, F. López-Gallego, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1593.
 - [163] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin u.a., **1993**.
 - [164] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam et al., **2008**.
 - [165] M. Bodanszky, *Peptide Chemistry. A Practical Textbook*, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin u.a., **1993**.
 - [166] M. Eberhardt, R. Mruk, R. Zentel, P. Théato, *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 1569–1575.
 - [167] M. N. Tahir, M. Eberhardt, P. Theato, S. Faiß, A. Janshoff, T. Gorelik, U. Kolb, W. Tremel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 922.
 - [168] L. Duque, B. Menges, S. Borros, R. Förch, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2818–2823.
 - [169] U. Edlund, T. Sauter, A.-C. Albertsson, *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 166–171.

-
- [170] S. M. Kang, B. Kong, E. Oh, J. S. Choi, I. S. Choi, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *75*, 385–389.
- [171] H.-W. Liu, C.-H. Chen, C.-L. Tsai, I.-H. Lin, G.-H. Hsiue, *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 1113.
- [172] G. W. Anderson, R. Paul, *J. Amer. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4423.
- [173] T. Böcking, K. A. Kilian, T. Hanley, S. Ilyas, K. Gaus, M. Gal, J. J. Gooding, *Langmuir* **2005**, *21*, 10522.
- [174] F. Cheng, L. J. Gamble, D. W. Grainger, D. G. Castner, *Anal. Biochem.* **2007**, *79*, 8781.
- [175] A. Pollak, H. Blumenfeld, M. Wax, R. L. Baughn, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6324.
- [176] J. Brygier, M. Gelbcke, C. Guermant, M. Nijs, D. Baeyens-Volant, Y. Looze, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1993**, *42*, 127.
- [177] S. C. Crowley, K. C. Chan, R. R. Walters, *J. Chromatogr. A* **1986**, *359*, 359.
- [178] D. Stöllner, F. W. Scheller, A. Warsinke, *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 157–165.
- [179] L. Betancor, F. López-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. D.-O. C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán, *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 877–882.
- [180] P. Batalla, M. Fuentes, C. Mateo, V. Grazu, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2230–2236.
- [181] Q. Hong, C. Rogero, J. H. Lakey, B. A. Connolly, A. Houlton, B. R. Horrocks, *Analyst* **2009**, *134*, 593.
- [182] C. Kasper, E. G. Vlak, E. F. Panarin, T. B. Tennikova, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *75*, 333.
- [183] R. Jordan, C. Taubmann, R. Luxenhofer, S. Cesana, *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 603.
- [184] S. P. Cullen, S. Ha, M. G. Lagally, P. Gopalan, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 5826–5838.
- [185] J. Drobník, V. Saudek, F. Švec, J. Kálal, V. Vojtíšek, M. Bárta, *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 1317.
- [186] R. Iwata, R. Satoh, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *62*, 288–298.
- [187] E. Yavuz, G. Bayramoğlu, B. F. Şenkal, M. Y. Arica, *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *113*, 2661–2669.
- [188] C. Lorenz, *Polymerschichten auf Titanoberflächen zur Anbindung von Proteinen*, Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, **2006**.

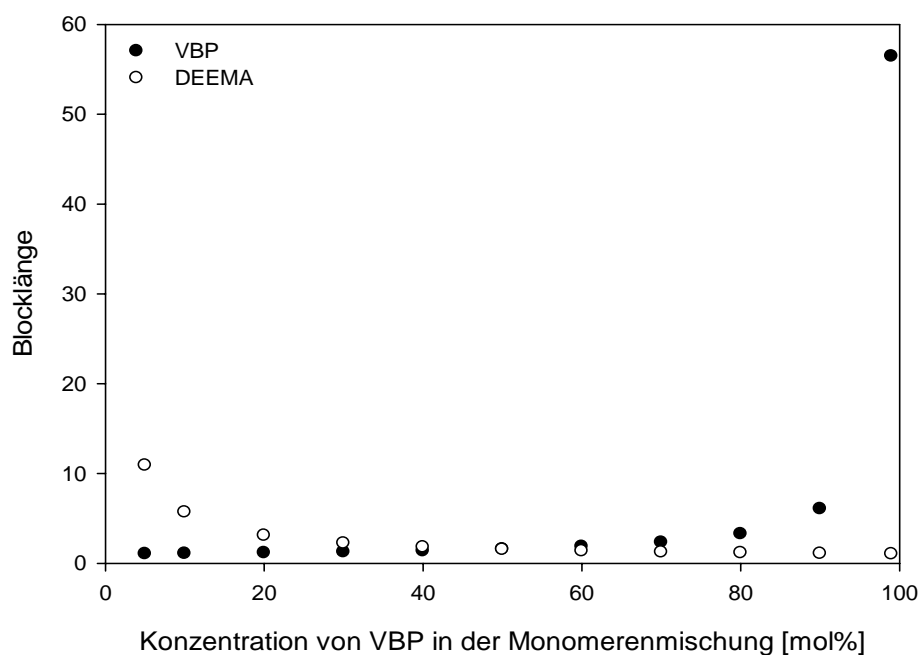
-
- [189] G. Lu, S. L. Bernasek, J. Schwartz, *Surf. Sci.* **2000**, *458*, 80–90.
- [190] B. M. Silverman, K. A. Wieghaus, J. Schwartz, *Langmuir* **2005**, *21*, 225.
- [191] M. Tanahashi, T. Matsuda, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *34*, 305–315.
- [192] R. A. Gemeinhart, C. M. Bare, R. T. Haasch, E. J. Gemeinhart, *J. Biomed. Mater. Res.* **2006**, *78A*, 433–440.
- [193] N. Adden, A. Hoffmann, G. Gross, H. Windhagen, F. Thorey, H. Menzel, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2007**, *18*, 303.
- [194] J. M. G. Cowie, V. Arrighi, *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, **2008**.
- [195] B. Tieke, *Makromolekulare Chemie: eine Einführung*, 2. Aufl. ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [196] M. D. Lechner, K. Kehrke, H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie : ein Lehrbuch für Chemiker, Physiker, Materialwissenschaftler und Verfahrenstechniker*, Basel u.a., **2010**.
- [197] B. Welz, D. L. G. Borges, in *Encyclopedia of Applied Spectroscopy* (Ed.: D. L. Andrews), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- [198] L. Ebdon, E. H. Evans, A. S. Fisher, S. J. Hill, *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **1998**.
- [199] L. H. J. Lajunen, *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*, The Royal Society of Chemistry, Bath, **1992**.
- [200] H. G. Tompkins, *A User's Guide to Ellipsometry*, Academic Press, San Diego, **1993**.
- [201] A. Röseler, *Infrared Spectroscopic Ellipsometry*, Akademie-Verlag, Berlin, **1990**.
- [202] B. Gruska, A. Röseler, in *Surface and Thin Film Analysis: Principles, Instrumentation, Applications* (Eds.: H. Bubert, H. Jenett), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**.
- [203] A. Bose, in *Wettability* (Ed.: J. C. Berg), Marcel Dekker Inc, New York u.a., **1993**.
- [204] J. N. Howe, *Interfaces in Materials*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1997**.
- [205] D. Pleul, F. Simon, in *Polymer Surfaces and Interfaces* (Ed.: M. Stamm), Springer-Verlag, Berlin u.a., **2008**.
- [206] F. J. Himpsel, I. Lindau, in *Encyclopedia of Applied Spectroscopy* (Ed.: D. L. Andrews), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- [207] I. Olefjord, in *Surface characterization: A user's sourcebook* (Eds.: D. Brune, R. Hellborg, H. J. Whitlow, O. Hunderi), Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [208] J. C. Rivière, *Surface Analytical Techniques*, Oxford University Press, Oxford, **1990**.

-
- [209] *Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy, Vol. 1*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester u.a., **1990**.
- [210] P. J. Murphy, *Organophosphorus Reagents*, Oxford University Press Inc., New York, **2004**.
- [211] J. Zábranský, M. Houska, Z. Plichta, J. Kálal, *Makromol. Chem.* **1985**, 186, 231.
- [212] J. Zábranský, M. Houska, J. Kálal, *Makromol. Chem.* **1985**, 186, 215.
- [213] D. Zaldívar, C. Peniche, A. Bulay, J. S. Román, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1993**, 31, 625.
- [214] M. M. Faragalla, D. J. T. Hill, A. K. Whittaker, *Polym. Bull.* **2002**, 47, 421.
- [215] M. Fernández-García, M. F. Torrado, G. Martínez, M. Sánchez-Chaves, E. L. Madruga, *Polymer* **2000**, 41, 8001.
- [216] T. Kelen, F. Tüdös, *J. Macromol. Sci., Chem.* **1975**, A9, 1.
- [217] C. Pfaffenroth, *Beschichtung von Zahnimplantaten mit Polymeren*, Master Thesis, Technische Universität Braunschweig, **2006**.
- [218] Persönliche Mitteilung von M. Slusznia, **2010**.
- [219] K. L. Christman, H. D. Maynard, *Polymer Preprints* **2005**, 46, 1286.
- [220] C.-H. Jang, B. D. Stevens, R. Phillips, M. A. Calter, W. A. Ducker, *Nano Lett.* **2003**, 3.
- [221] K. Wadu-Mesthrige, S. Xu, N. A. Amro, G.-y. Liu, *Langmuir* **1999**, 15, 8580.
- [222] N. A. A. Rossi, Y. Zou, M. D. Scott, J. N. Kizhakkedathu, *Macromolecules* **2008**, 41, 5272.
- [223] J. Hwang, R. C. Li, H. D. Maynard, *J. Controlled Release* **2007**, 122, 279–286.
- [224] K. L. Christman, H. D. Maynard, *Langmuir* **2005**, 21, 8389.
- [225] C. Sittig, M. Textor, N. D. Spencer, M. Wielang, P.-H. Vallotton, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1999**, 10, 35.
- [226] R. C. Li, R. M. Broyer, H. D. Maynard, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2006**, 44, 5004–5013.
- [227] J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, K. D. Bomben, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of XPS Data*, 2nd ed., Perkin-Elmer Corporation Physical Electronics Division, **1992**.
- [228] E. L. Hanson, J. Schwartz, B. Nickel, N. Koch, M. F. Danisman, *J. Amer. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16074.

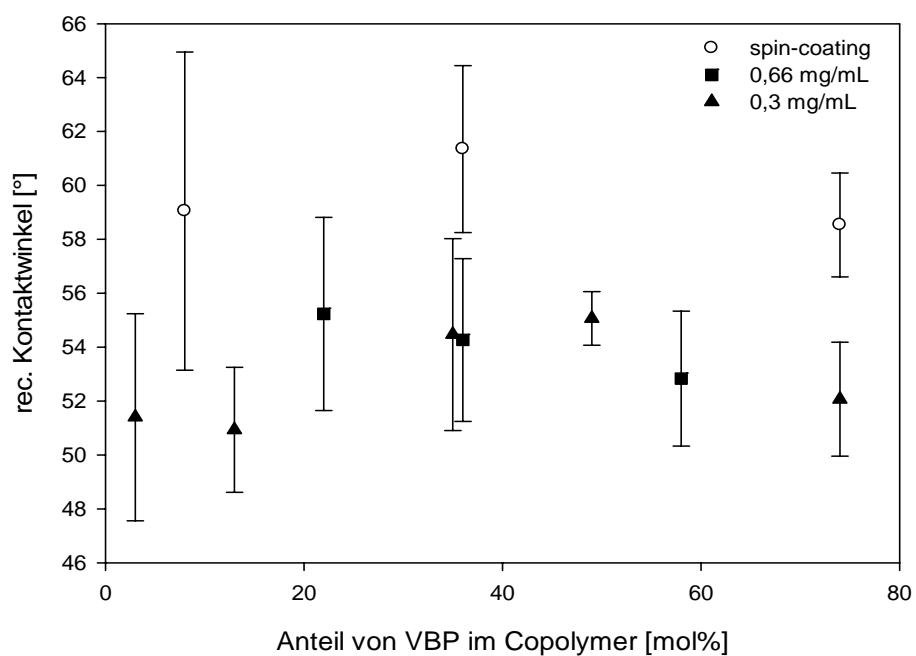
-
- [229] M. P. Danahy, M. J. Avaltroni, K. S. Midwood, J. E. Schwarzbauer, J. Schwartz, *Langmuir* **2004**, *20*, 5333.
- [230] J. H. Lee, D. G. Bucknall, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **2008**, *46*, 1450–1462.
- [231] G. Bayramoğlu, E. Batislam, M. Y. Arica, *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *112*, 1012.
- [232] R. Gonçalves, M. C. L. Martins, M. J. Oliveira, G. Almeida-Porada, M. A. Barbosa, *J. Biomed. Mater. Res.* **2010**, *94A*, 576–585.
- [233] S. L. McArthur, M. W. Halter, V. Vogel, D. G. Castner, *Langmuir* **2003**, *19*, 8316.
- [234] S. M. Martin, R. Ganapathy, T. K. Kim, D. Leach-Scampavia, C. M. Giachelli, B. D. Ratner, *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *67A*, 334–343.
- [235] S. Vasin, R. A. Geanangel, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, *160*, 167.
- [236] D. Logeart-Avramoglou, M. Bourguignon, K. Oudina, P. Ten Dijke, H. Petite, *Anal. Biochem.* **2006**, *349*, 78.
- [237] J. Vörös, M. Wieland, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, D. M. Brunette, in *Titanium in Medicine*, Springer, Berlin, **2001**.
- [238] F. J. Xu, H. Z. Li, J. Li, Y. H. E. Teo, C. X. Zhu, E. T. Kang, K. G. Neoh, *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 773.
- [239] Y. H. Yan, J. Cui, M. B. Chan-Park, X. Wang, Q. Y. Wu, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 115712.
- [240] C. Pfaffenroth, A. Winkel, W. Dempwolf, L. J. Gamble, D. G. Castner, M. Stiesch, H. Menzel, *Macromolecular Bioscience* **2011**, *11*, 1515.
- [241] D. Brady, J. Jordaan, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639–1650.
- [242] W. N. E. v. Dijk-Wolthuis, J. J. K.-v. d. Bosch, A. v. d. K.-v. Hoof, W. E. Hennink, *Macromolecules* **1997**, *30*, 3411.
- [243] P. H. Findlay, D. C. Sherrington, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5970.
- [244] A. V. Reis, A. R. Fajardo, I. T. A. Schuquel, M. R. Guilherme, G. J. Vidotti, A. F. Rubira, E. C. Muniz, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3750.
- [245] N. Timpe, *Untersuchung der Schichtdicke eines Copolymerfilms in Abhängigkeit von der Beschichtungsmethode*, Praktikums-Bericht, TU Braunschweig, **2009**.
- [246] A. R. Khare, N. A. Peppas, *Biomaterials* **1995**, *16*, 559.
- [247] S. Beltran, J. P. Baker, H. H. Hooper, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, *Macromolecules* **1991**, *24*, 549.
- [248] M. Şen, O. Güven, *Comput. Theor. Polym. Sci.* **2000**, *11*, 475.
- [249] J. Rička, T. Tanaka, *Macromolecules* **1984**, *17*, 2916.

- [250] M. Ahrens, T. Ankenbauer, D. Schröder, A. Hollnagel, H. Mayer, G. Gross, *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*, 871.
- [251] Roche, *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*, Vol. 08, www.roche-applied-science.com, **2011**.
- [252] Z. Shi, K. G. Neoh, E.-T. Kang, C. Poh, W. Wang, *Tissue Eng.* **2009**, *15*, 417.
- [253] I. Zemanová, J. Turková, M. Capka, L. A. Nakhapetyan, F. Svec, J. Kálal, *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 229.
- [254] Persönliche Mitteilung von N. Adden, **2006**.
- [255] F. Thorey, H. Menzel, C. Lorenz, G. Gross, A. Hoffmann, H. Windhagen, *Indian Journal of Orthopaedics* **2011**, *45*, 57.
- [256] H. P. Jennissen, M. Chatzinikolaidou, H. Rumpf, U.S. Patent 2008/0260799, **2008**.
- [257] N. Ehlert, P. P. Müller, M. Stieve, P. Behrens, *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *131*, 51–57.
- [258] N. Ehlert, A. Hoffmann, T. Luessenhop, G. Gross, P. P. Mueller, M. Stieve, T. Lenarz, P. Behrens, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1772–1779.

Anhang



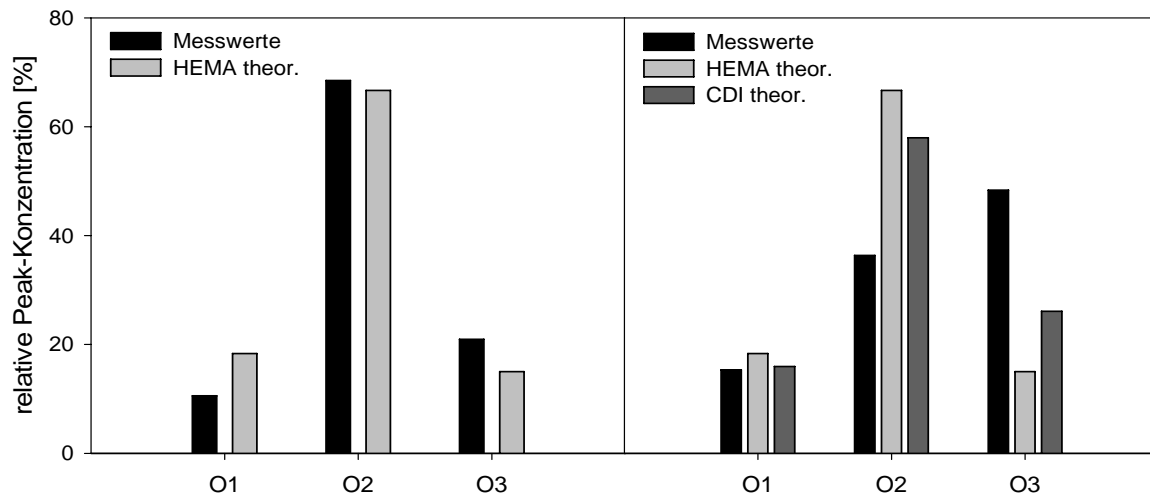
Anhang-Abbildung 1: Berechnete Blocklängen bei der Copolymerisation von VBP mit DEEMA



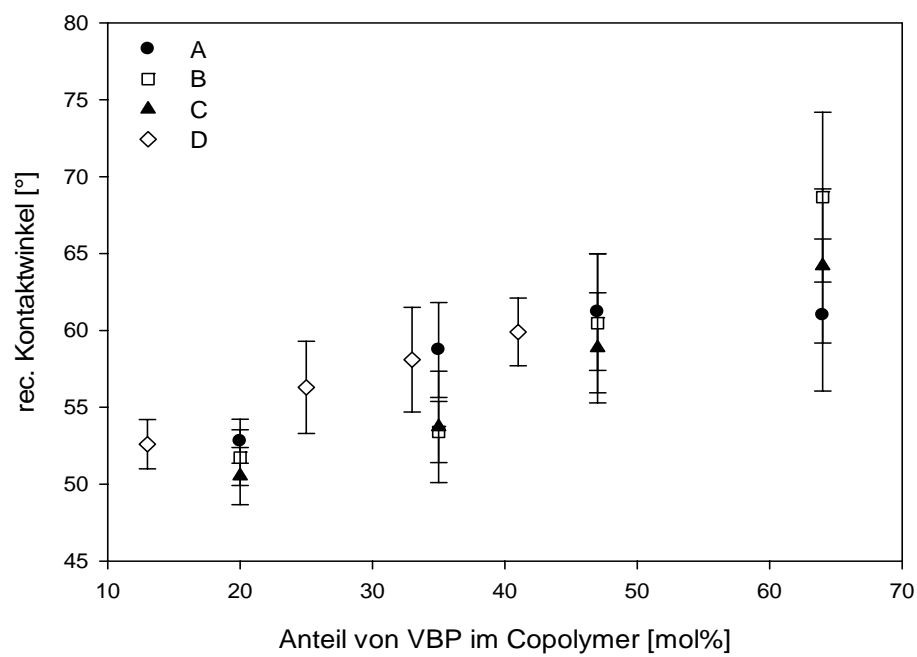
Anhang-Abbildung 2: rückschreitende Kontaktwinkel für Filme aus Poly-VBP-co-HEMA

Anhang-Tabelle 1: Schichtdicken von Filmen aus Poly-VBP-co-HEMA mit verschiedenen Zusammensetzungen an Luft und unter Millipore-Wasser

<i>Anteil VBP [%]</i>	<i>Schichtdicke an Luft [nm]</i>	<i>Schichtdicke in Millipore-Wasser [nm]</i>
3	8 ± 2	$157,9 \pm 7$
35	7 ± 1	148 ± 2
55	7 ± 2	157 ± 2
74	7 ± 1	149 ± 4



Anhang-Abbildung 3: Anteile der Sauerstoffe aus den hochaufgelösten Sauerstoff-Spektren vom unbehandelten und mit CDI umgesetzten Film von Poly-VBP-co-HEMA mit 55 % VBP



Anhang-Abbildung 4: rückschreitende Kontaktwinkel für Filme aus Poly-VBP-co-GMA in Abhängigkeit von der Zusammensetzung